ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. IX No 2

1 9 6 0

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
4 JUL 1961

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. IX No 2

1960
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek rzeczywisty PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Wrocław, Eugeniusz Pijanowski, członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Dział rolny — J. Gołębiowska, Poznań
Dział przemysłowy — J. Jakubowska, Łódź i S. Bujak, Lublin

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
ODDZIAŁ WROCŁAWSKI

Nakład 1061+129 egz.	Oddano do składania 2.II.1960 r.
Ark. wyd., 10,25 druk. 9	Podpisano do druku 25.VI.1960 r.
Pap. druk. sat. kl. III, 80 g, 70×100	Druk ukończono w czerwcu 1960 r.
Cena zł 25,—	Zam. nr 41/60 H-17

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9: 107-132

T. M. Lachowicz

MECHANIZM POWSTAWANIA FORM OPORNYCH NA PENICYLINĘ*

Z Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego i z Zakładu Genetyki Drobnoustrojów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Wpłynęło dnia 15 maja 1959 r.

WSTĘP

Problem powstawania oporności na leki u mikroorganizmów pojawił się wraz z rozwojem chemoterapii. Obserwowany w okresie 15 lat wzrost zainteresowania się nim wiąże się ściśle z postępem w lecznictwie, skojarzonym z wprowadzeniem antybiotyków i równoległym z tym narastaniem przypadków chorobowych spowodowanych przez szczepy oporne. Przejawem tego wzrastającego zainteresowania jest szereg prac o podejściu klinicznym, biochemicznym, fizjologicznym, a ostatnio i genetycznym, poświęconych temu zagadnieniu. Genetyczny aspekt lekooporności jest przedmiotem dyskusji, której pewne akcenty przypominają spory toczone u zarania myśli ewolucyjnej w biologii. Ta paradoksalna na pozór sytuacja wynikła z powszechnego do niedawna przekonania, że bakterie posiadają odmienny niż organizmy wyższe mechanizm dziedziczenia. Z drugiej znów strony małe rozmiary ciała, przy względnie dużej powierzchni, i nieposiadanie własnego środowiska wewnętrznego sprawiają, że są one bardziej podatne na działanie wpływów czynników środowiskowych aniżeli organizmy wyższe (Kunicki-Goldfinger 1954). Stąd zmienność w świecie bakterii jest znacznie częstsza niż wśród organizmów wyższych. Ograniczony zasięg rozmnażania płciowego wśród bakterii w większości wypadków uniemożliwia analizę genetyczną zmienności taką, jaka jest możliwa w przypadku organizmów wyższych.

Zagadnienie mechanizmu powstawania oporności na leki dostarcza dodatkowych trudności, związanych z samym jej rozwojem. Oporność na

* Część rozprawy doktorskiej, przedłożonej w Uniwersytecie Wrocławskim.

większość leków narasta stopniowo pod wpływem pasaży przez podłoża z wzrastającymi stężeniami leku, co pozwala przypuszczać, że jest to proces wynikający z długiego, bezpośredniego oddziaływania leku na mikroorganizm. Przypuszczenie to wydają się potwierdzać obserwacje nad zależnością między stopniem utrwalenia się oporności a długością kontaktu z lekiem (czas trwania treningu). Trudności uzyskania form opornych bez kontaktu z lekiem przez długi czas umożliwiały wyciąganie wniosków odnośnie ich ewentualnego pochodzenia, jedynie na podstawie pośrednich obserwacji nad przekształcaniem się wrażliwej na lek populacji bakteryjnej w oporną. W oparciu o liczne fakty towarzyszące temu procesowi powstały różne hipotetyczne modele mechanizmu powstawania i rozwoju lekooporności.

MODELE ROZWOJU LEKOOPORNOŚCI

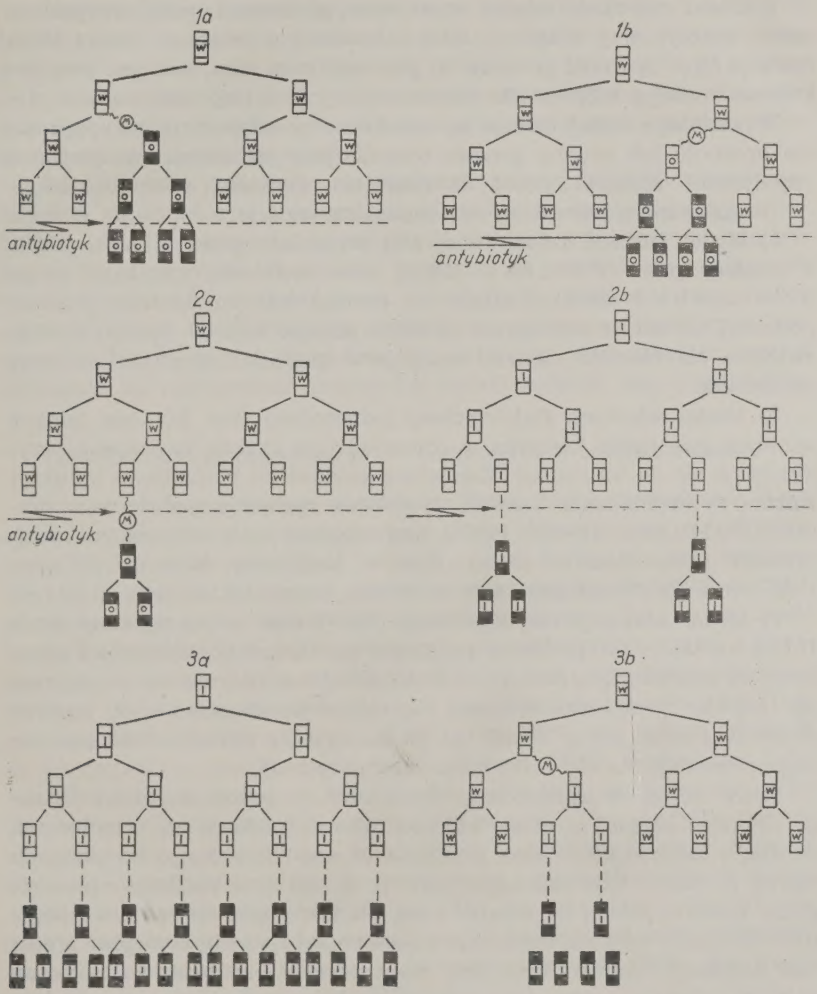
Różnorodne modele tłumaczące mechanizm powstawania form opornych na leki można podzielić na dwie zasadnicze grupy, w zależności od poglądu na pochodzenie pierwszej opornej komórki. Według pierwszej grupy oporna na antybiotyk populacja bakteryjna powstaje z komórki opornej, obecnej w wrażliwej populacji wyjściowej przed zadziałaniem leku. Grupę tę można objąć wspólnym określeniem koncepcji preadaptacyjnych. Drugą grupę stanowią koncepcje postadaptacyjne. Zakładają one udział leku w powstawaniu form nań opornych.

Różnorodne modele powstawania lekooporności przedstawia rys. 1, zaczerpnięty z pracy Brysona i Szybalskiego (1955).

Model adaptacji genetycznej lub mutacji spontanicznej i selekcji (*1a*). Punktem wyjścia jest założenie, że oporność danej populacji wrażliwych bakterii jest ograniczona genotypem. Możliwość wyjścia poza te ramy stwarza mutacja lub inna przemiana genetyczna, zachodząca przypadkowo (spontanicznie) z bardzo małą częstością. Na podłożu bez leku taki spontanicznie powstały mutant nie ma możliwości ujawnienia się. Możliwość tę stwarza podłoże z lekiem, na którym rozwój wrażliwych komórek jest zahamowany. Lek działa więc jedynie jako czynnik selekcjonujący, umożliwiający opanowanie środowiska przez potomstwo opornego mutanta. Powrót do wrażliwości jest możliwy jedynie poprzez mutację powrotną lub mutację w innym miejscu, modyfikującą działanie pierwszej mutacji.

Pewne odchylenie od tego stanowi model rozwoju oporności poprzez spontaniczną mutację i selekcję z fenotypowym opóźnieniem (*1b*).

Różnicę stanowi opóźnione o jedną lub kilka generacji fenotypowe ujawnienie się mutanta, będące wynikiem segregacji.



Rys. 1. Różne możliwe drogi powstawania lekooporności wg Brysona i Szybalskiego (1955)

1 a — Mutacja spontaniczna i selekcja, 2 a — Mutacja indukowana przez lek, 3 a — Adaptacja jednorodna całej populacji, 1 b — Mutacja spontaniczna z fenotypowym opóźnieniem i selekcja, 2 b — Adaptacja niejednorodna, 3 b — Adaptacja warunkowana poprzednią mutacją spontaniczną

Fig. 1. Possible mechanisms of the appearance of penicillin-resistant forms of bacteria (Bryson and Szybalski 1955)

1 a — Spontaneous mutation and selection, 2 a — Mutation induced by the drug, 3 a — Homogenous adaptation of the whole population, 1 b — Spontaneous mutation with phenotypic lag and selection, 2 b — Heterogenous adaptation, 3 b — Adaptation conditioned by previous spontaneous mutation

Pośredni charakter między wymienionymi dwoma modelami posiada model fenotypowej adaptacji uwarunkowanej poprzednią spontaniczną mutacją (*3b*). Oporność powstaje tu pod wpływem leku, lecz jest uwarunkowana mutacją, która zaszła spontanicznie przed jego zadziałaniem.

Wymienione wyżej modele są zasadniczo preadaptacyjnymi, gdyż sama oporność lub zmiana genowa warunkująca ją zachodzi na poziomie pojedynczej komórki przed zadziałaniem czynnika selekcjonującego.

Drugą grupę reprezentują trzy zasadnicze modele:

a) Model mutacji indukowanej (*2a*) wysunięty przez Linza (1950), a poparty przez Vourekę (1952) oraz częściowo wynikami pracy Newcombe'a (1955). Zakłada on swoiste lub, co bardziej prawdopodobne, nieswoiste mutagenne działanie samego leku, w wyniku którego zwiększa się również częstość mutacji w kierunku oporności na dany antybiotyk.

b) Model adaptacji fizjologicznej jednorodnej (*3a*). Ma ona miejsce wówczas, gdy każda komórka w odpowiedzi na zmianę środowiska przystosowuje się do tej zmiany. Zmienione środowisko kierunkowo indukuje zmianę w metabolizmie bakterii. Model ten znalazł uzasadnienie w pracach Pollocka (1953a, 1953b) nad adaptacyjnym tworzeniem penicylinazy przez *Bacillus cereus*, oraz w badaniach Monod (Cohn i Monod 1953) nad adaptacyjną syntezą beta-galaktozydazy u *E. coli*.

c) Model adaptacji niejednorodnej (*2b*). Został on opracowany przez Hinshelwooda (1946) na podstawie badań nad powstawaniem oporności na proflawinę u *Bacterium lactis aerogenes* (*Aerobacter aerogenes*), jak również przystosowywaniem się tego mikroorganizmu do nowych źródeł węgla lub azotu. Model ten można określić terminem automatycznego przestawiania się równowagi enzymatycznej.

Różni się on od poprzedniego założeniem, że proces adaptacji wymaga pewnego okresu, w czasie którego bakterie poddane są szkodliwemu działaniu środowiska. Szansa przeżycia okresu niezbędnego do adaptacji zależy od stanu fizjologicznego bakterii, a pod tym względem poszczególne komórki różnią się między sobą. Stąd w populacji bakterii poddanych działaniu leku ma miejsce pewnego rodzaju wyścig pomiędzy procesem adaptacji a zamieraniem, przy czym stężenie leku i stan fizjologiczny bakterii decydują o tym, jaka frakcja wyjdzie zwycięsko z tego wyścigu. Strona fizyczna powstawania oporności w tym modelu sprowadza się do automatycznego przestawienia równowagi enzymatycznej, wynikającej z potrzeby uruchomienia nowych dróg metabolizmu, omijających zablokowany punkt. Trwałość oporności jest uwarunkowana stopniem utrwalenia się nowej równowagi enzymatycznej. Tłumaczy to związek między stopniem oporności a stężeniem leku, na jakim dana forma oporna wyrosła, oraz rewersję do formy wrażliwej (Dean 1955).

Odrębne nieco zagadnienie przedstawia wysunięty przez Yudkina (1953) model klonalnej zmienności i selekcji. Zakłada on nierównocenność pod względem oporności komórek potomnych, powstałych po podziale komórki macierzystej, w wyniku nierównego rozdziału materiału warunkującego jej oporność. Lek, selekcjonując formy mniej oporne, zwiększa przeciętną oporność populacji.

Tak więc czas pojawiania się pierwszej opornej komórki stanowi zasadnicze zagadnienie w toczącym się od lat sporze nad pochodzeniem lekooporności. Bezpośrednie wyizolowanie bakterii opornych na lek bez jego udziału napotyka na znaczne trudności, ze względu na rzadkie ich występowanie. Aby otrzymać jedną oporną formę, konieczne jest przebadanie oporności kilku milionów bakterii, co przekracza praktyczne możliwości. Pewne jednak konsekwencje przyjęcia wymienionych modeli pozwalają na opracowanie pośrednich metod badania tego zagadnienia.

DOWODY NA PREADAPTACYJNE POCHODZENIE LEKOOPORNOŚCI

Zasadniczą konsekwencją preadaptacyjnych modeli pochodzenia lekooporności jest klonalne występowanie form aktualnie lub potencjalnie opornych. Na tym opierają się wszystkie testy mające na celu wykazanie, że oporne na lek formy powstają spontanicznie bez jego udziału. Pierwszy tego typu test został opracowany przez Lurię i Delbrücka (1943). Test ten, określany terminem fluktuacyjnego, zastosowany pierwotnie w celu wykazania mutacyjnego pochodzenia oporności na faga, użyto następnie do badań nad pochodzeniem lekooporności (Demerec 1948, Newcombe i Hawirko 1949), jak i form zdolnych do korzystania z nowego źródła węgla (Ryan 1952). Warunkiem fluktuacji w ilości mutantów w oddzielnych hodowlach, zainicjowanych ilością bakterii wykluczającą preegzystencję mutanta, jest nie tylko spontaniczność mutacji, lecz również brak selekcji w stosunku do niego. Stwarza to pewne ograniczenie w zastosowaniu testu i może tłumaczyć niekiedy uzyskiwane ujemne wyniki (Welsch 1952, Newcombe i Hawirko 1949). Zarówno strona metodologiczna, jak i teoretyczna testu wzbudziły poważne zastrzeżenia (Dean i Hinshelwood 1952, Eriksen 1953, Banic 1954, Sneath 1955).

Na podstawie obserwacji nad występowaniem jednakowych morfologicznie, opornych form w próbkach z oddzielnych hodowli, opracowano test korelacji między klonalnym rozmieszczeniem oporności i związanych z nią cech (correlation between relatives tests). Cavalli-Sforza (1952) wykazał nim klonalne, a tym samym preadaptacyjne pochodzenie opornych na chloramfenikol form *E. coli*. Test ten polega na statystycznym porównaniu różnic w oporności między opornymi kolonia-

mi o tej samej morfologii z różnicami w oporności między różnymi morfologicznymi formami. Korelacja oporności lub innej cechy z podobieństwem morfologicznym w połączeniu z występowaniem form skorelowanych w próbce z jednej hodowli, znajduje racjonalne wytłumaczenie w klonalnym pochodzeniu bakterii.

Słabą stroną obydwu tych testów jest trudność wykazania równocenności fizjologicznej bakterii w oddzielnych hodowlach. W przypadku testu fluktuacyjnego istnieje możliwość, że nie kontrolowane czynniki środowiskowe mogą zwiększać lub zmniejszać frakcję bakterii zdolną do adaptacji. W przypadku testu korelacji, te trudne do kontroli różnice między oddzielnymi hodowlami mogą faworyzować rozwój tego lub innego typu morfologicznego, charakteryzującego się odpowiednim stopniem oporności. Wysuwający tego typu zastrzeżenia uważają, że nie należy spodziewać się korelacji pomiędzy ilością form opornych w próbkach z oddzielnych hodowli a ich przeciętną opornością (Dean 1955). Brak tego typu korelacji stwierdził Cavalli-Sforza (1952), uznając to za dowód klonalnego, a tym samym mutacyjnego pochodzenia oporności (test of the environmental variation).

Nie bez zastrzeżeń jest również metoda statystycznych klonów, opracowana przez Newcomba (1949) w modyfikacji Bronscheina (1951). Rozcieranie mikrokolonii może zwiększać szansę adaptacji (Dean 1955).

Najbardziej przekonywającego dowodu, że oporność może powstać na drodze mutacji spontanicznej, dostarcza metoda replik Lederbergów. Metodą tą wykazano preadaptacyjne pochodzenie zarówno form w pełni jak i częściowo opornych na streptomycynę (Lederberg i Lederberg 1952, Vandermeulen 1957), izoniacyd (Bryson i Szybalski 1952), tworzenie penicylinazy u pewnego szczepu *B. cereus* (Sneath 1955).

Uzyskanie opornych na lek szczepów bakteryjnych bez udziału leku umożliwia również metoda pośredniej selekcji Cavalli i Lederberga (1956, wg Cavalli-Sforza 1957).

INNE DOWODY MUTACYJNEGO POCHODZENIA LEKOOPORNOŚCI

Wymienione powyżej metody wykazują, że formy oporne na leki mogą powstawać bez ich udziału. Częstość ich powstawania jest bardzo mała, rzędu $1 : 10^{-6}$, $1 : 10^{-9}$ na bakterię na generację. Z tego rzędu częstością pojawiają się mutacje genowe u organizmów wyższych. Równocześnie te same czynniki, które zwiększają częstość mutacji genowych, jak np. promienie ultrafiołkowe, iperyt azotowy czy H_2O_2, zwiększają częstość występowania form opornych na leki (Wyss i inni 1947, De-

merec 1951, Bretani 1951). Świadczy to o jednakowym podłożu obydwu typów zmian.

Dalszego dowodu związku lekooporności z materiałem genetycznym dostarczyła analiza rekombinacji u *E. coli* K_{12}. Wykazała ona, że jeden locus warunkuje pełną streptomycynooporność jak i streptomycynozależność u tego mikroorganizmu (Demerec 1957. Newcombe i Nelson 1950 wg Demereca 1957). W przypadkach, gdy oporność rozwija się stopniowo wykazano istnienie kilku segregujących się genów (Cavalli i Maccacaro 1950, 1952), rządzących jej rozwojem. Segregacja lekooporności jak i oporności na faga świadczy o tym, że czynniki warunkujące ją zachowują się podobnie jak geny.

Związek lekooporności z materiałem genetycznym potwierdziły doświadczenia nad transformacją tej cechy (Hotchkiss 1951, Alexander i Leidy 1953) oraz transdukcją (Zinder i Lederberg i in. wg Demereca 1957).

Przytoczone dane doświadczalne świadczą niewątpliwie, że oporne na leki warianty mogą powstawać bez udziału leku, a oporność jest uwarunkowana zmianami w materiale genetycznym. Z kolei nasuwa się pytanie, czy modele preadaptacyjne tłumaczą wszystkie fakty związane z rozwojem lekooporności i jaki jest ewentualny w tym udział innych modeli.

ROLA ADAPTACJI FIZJOLOGICZNEJ

Rola adaptacji w rozwoju oporności na penicylinę u *B. cereus* lub w syntezie beta-galaktozydazy u *E. coli* została wyczerpująco określona i nie budzi zastrzeżeń. Problemem dyskusyjnym pozostaje nadal udział procesów adaptacyjnych w ujęciu Hinshelwooda w powstawaniu oporności na leki. Dowody, jakie szkoła jego przytacza na poparcie twierdzenia, że rozwój oporności na proflawinę, między innymi u *Aerobacter aerogenes*, odbywa się wg tego modelu, zostały zaczerpnięte z obserwacji nad zmianami jakie zachodzą w populacji bakterii w czasie rozwoju oporności, jak i przy jej zaniku. Dotyczą one skracania się fazy zastoju w miarę treningu, zależności stopnia oporności od stężenia do jakiego przeprowadzano trening, wreszcie związku między trwałością oporności a długością treningu (Dean i Hinshelwood 1953, 1957, Dean 1955). Metody, jakimi posługiwano się przy tym, nie zawsze jednak pozwalały wykluczyć selekcję, stąd i ich wyniki nie zawsze pozwalają na jednoznaczną interpretację.

Niektóre obserwacje tej szkoły nie znalazły potwierdzenia w ostatnich badaniach Yudkina (Tornley i Yudkin 1959a i b, Sinai i Yudkin 1959a i b). Stwierdzono wprawdzie pewien udział procesów adap-

tacyjnych w rozwoju oporności na proflawinę, niemniej jednak zasadniczym mechanizmem jest mutacja spontaniczna. Prace te wskazują, że rozwój oporności na lek może odbywać się różnymi drogami.

ANTYBIOTYKI JAKO MUTAGENY

Nie wszystkie fakty obserwowane przy rozwoju oporności na leki znajdują wytłumaczenie w spontanicznej mutacji i selekcji lub modelu adaptacyjnym. W ostatnich latach coraz częściej dyskutowana jest możliwość mutagennego działania antybiotyków. Może ona znaleźć uzasadnienie zarówno w przesłankach logicznych jak i w wynikach pewnych doświadczeń.

Z teoretycznego punktu widzenia, przyjmując mutacje za pomyłki w odtwarzaniu materiału dziedzicznego, wydaje się dość prawdopodobne, że w warunkach zaburzeń w metabolizmie prawdopodobieństwo takich pomyłek będzie większe. Bardziej wątpliwe wydaje się kierunkowe działanie indukcyjne antybiotyków, chociaż streptomycynozależność u *E. coli* pozwala i na tego rodzaju przypuszczenie (Linz 1950).

Znane są też fakty dziedzicznych zmian, spowodowanych działaniem barwników i antybiotyków. Akryflawina indukuje u drożdży powstawanie małych, karłowatych kolonii w wyniku zaniku części aparatu oddechowego (Ephrussi i Hottinguer 1951). Streptomycyna powoduje dziedziczny zanik chloroplastów u *Euglena* i pewnych wyższych roślin. Trypaflawina powoduje u *Haemoflagellata* zanik ciałek parabazalnych. Czynnik kappa u *Paramaecium* pod wpływem chloromycetyny lub analogonów puryny ulega zanikowi. Powyższe przykłady są charakterystyczne z dwóch względów: po pierwsze dotyczą one zaniku cząstek obdarzonych zdolnością samoodtwarzania się, a więc cechą przypisywaną kwasom nukleinowym, z drugiej zaś strony nie wykazano, aby nowe warianty znajdowały się w korzystniejszej selekcyjnie pozycji, aniżeli formy wyjściowe.

Dokonano też obserwacji, pozwalających na wysunięcie przypuszczenia, że antybiotyki działają mutagennie i na bakterie. Voureka (1952) stwierdził, przy zastosowaniu analizy zachowania się pojedynczych komórek, że chloramfenikol, penicylina, iperyt azotowy i perhydrol indukują u gronkowca takie same zmiany, włącznie ze wzrostem oporności na penicylinę i streptomycynę, zatratą zdolności fermentacyjnych, zjadliwości, koagulazotwórczości i swoistości fagowej. Obserwacje te znajdują poparcie w badaniach Manten i Rowleya nad *E. coli* K_{12} (wg Cavalli i Lederberga 1955), w których otrzymano indukcję zmian morfologicznych pod wpływem chloramfenikolu i przeciwciał.

Nieznaczny, lecz niemniej wyraźny, wzrost częstości mutacji w kierunku częściowej oporności na streptomycynę pod wpływem tego anty-

biotyku obserwowali Newcombe i McGeorge (1951, wg Newcombe 1955).

Pewne obserwacje nad powstawaniem lekooporności nie znajdują pełnego wytłumaczenia w modelu spontanicznej mutacji i selekcji. Inkubując bakterie na podłożu płynnym z antybiotykiem otrzymywano wtórny wzrost niejednokrotnie dopiero po upływie 48 godzin, a nawet kilku dni. Preegzystencja opornego mutanta powinna objawić się wzrostem już po 24 godzinach (Eriksen 1949, Linz 1950). Obserwacje te nie znajdują wytłumaczenia i w modelu Hinshelwooda, gdyż liczne badania wykazały, że sama przeżywalność nie zwiększa oporności (Rantz i Kirby 1944).

Pojawianie się form opornych na antybiotyki jest związane z podziałami komórkowymi (Eriksen 1949, Banic 1954, Linz 1950).

O skokowym powstawaniu form opornych na leki świadczy tworzenie się wtórnych opornych kolonii na podłożach z subletalnymi stężeniami leków. Kolonie te, oporne na znacznie wyższe stężenia antybiotyków niż stężenia, na jakich wyrosły, pojawiają się na tle skąpego wzrostu bakterii wrażliwych, których podziały uległy zahamowaniu w obecności leku, ale nie uległy całkowitemu zatrzymaniu. W wyniku tych zwolnionych podziałów bakterie te wytworzyły mikrokolonie. Niejednokrotnie obserwowano, że niemal każda mikrokolonia wytwarzała wtórną kolonię oporną. W celu wytłumaczenia tego zjawiska zakłada się, że w czasie tych zwolnionych podziałów powstają spontanicznie mutanty wytwarzające następnie wtórne kolonie (Demerec 1957). Mała jednakże częstość mutacji spontanicznych czyni tego rodzaju tłumaczenie mało prawdopodobne. Pojawienie się opornych form na tle skąpego wzrostu o wiele łatwiej daje się wytłumaczyć mutagennym działaniem podłoża. Przy omawianiu tego zagadnienia często spotkać można odwoływanie się do badań Novika i Szilarda nad częstością mutacji w hodowli spoczynkowej, z których wynika, że tempo mutacji jest raczej proporcjonalne do czasu niż do ilości generacji. Badania te jednak wymagają potwierdzenia i komplikują znacznie obraz samego mechanizmu mutacji.

OPORNOŚĆ NA PENICYLINĘ U GRONKOWCA ZŁOCISTEGO

Szczepy gronkowca oporne na działanie penicyliny można podzielić na trzy zasadnicze grupy (Barber 1953a, 1957):

1. rozkładające penicylinę
2. tolerujące penicylinę
3. zależne od penicyliny.

Podział ten uzasadniają z jednej strony różnice w mechanizmie warunkującym oporność, z drugiej zaś różnice w występowaniu i związane

z tym znaczenie kliniczne. Mogą one również obejmować mechanizm powstawania. Szczepy, których oporność na penicylinę uwarunkowana jest zdolnością jej rozkładania (szczepy penicylinazotwórcze) różnią się znacznie pod wymienionymi względami od dwóch pozostałych grup. Szczepy te izoluje się głównie z przypadków klinicznych, gdzie ze względu na tworzenie penicylinazy są poza skutecznym zasięgiem leczenia penicyliną. Dwie pozostałe grupy stwierdza się w przypadkach klinicznych bardzo rzadko. Szczepy te otrzymuje się głównie *in vitro*, a mechanizm, lub raczej mechanizmy warunkujące ich oporność są dotychczas nie znane.

GRONKOWCE PENICYLINAZOTWÓRCZE

Szczepy rozkładające penicylinę na drodze enzymatycznej spotyka się wśród wielu gatunków bakterii (Bondi i Dietz 1946, Woodruff i Foster 1945). Rozkładające penicylinę szczepy gronkowca zaczęto stwierdzać w przypadku zakażeń nie dających się leczyć penicyliną, od czasu wprowadzenia tego antybiotyku do terapii (Bondi i Dietz 1945. Barber i Rozwadowska-Dowzenko 1948, Forbes 1949). W miarę coraz szerszego stosowania penicyliny wzrastała ilość przypadków chorobowych, z których izolowano szczepy penicylinazotwórcze gronkowca, jak i procent nosicielstwa tych szczepów.

Wrażliwość na penicylinę szczepów penicylinazotwórczych wykazuje znaczną zależność od ilości bakterii w inokulum (Kirby 1945, Bondi i Dietz 1946, Barber 1947). Pojedyncze komórki nie różnią się stopniem oporności od szczepów wrażliwych niepenicylinazotwórczych (Bondi i Dietz 1948, Gilson i Parker 1948). Penicylinooporność penicylinazotwórczych gronkowców obniżają niektóre substancje jak np. azydek sodu, interferujące z produkcją tego enzymu (Dietz i Bondi 1948). Poza wytwarzaniem penicylinazy szczepy te nie różnią się od niepenicylinazotwórczych ani pod względem biochemicznym (Barber 1947), ani też w zasadniczy sposób pod względem wymagań odżywczych (Bondi, Kornblum i St. Phalle 1954).

Znaczna różnica poglądów zaznacza się jeśli chodzi o naturę penicylinazy gronkowcowej. Część badaczy (Bondi, St. Phalle, Kornblum i Moat 1954. Kirby 1945, Gilson i Parker 1948) uważa penicylinazę gronkowcową za endoenzym związany z komórką bakteryjną i nie dyfundujący do podłoża. Inni utrzymywali, że jest to egzoenzym (Housewright i Henry 1947, Gots 1945), dyfundujący do podłoża, a trudność wykrycia penicylinazy w przesączach wiązali z adsorbowaniem się jej na sączkach (Eriksen i Hansen 1954). Adsorpcja penicylinazy nie zachodzi jedynie na sączkach gradokolowych.

Pod względem serologicznym penicylinaza gronkowcowa przypomina penicylinazę *Bacillus cereus* (Housewright i Henry 1947). Uważana jest ona za enzym konstytucyjny (Bondi, St. Phalle, Kornblum, Moat 1954). Ostatnio jednak wbrew poprzednim doniesieniom stwierdzono znaczny wpływ penicyliny na ilość wytwarzanej przez gronkowce penicylinazy (Lippman, Cohen 1957, 1958). Zdolność tworzenia penicylinazy jest cechą trwałą, utrzymującą się w czasie pasaży przez podłoża bez antybiotyku. Zanik penicylinazotwórczości obserwowano w wyniku działania innych antybiotyków (Barber 1953b), działania na hodowle wysoką temperaturą, lub pod wpływem starzenia się hodowli (Barber 1949a, Fairbrother 1956). Na duże trudności napotykało otrzymanie form penicylinazotwórczych *in vitro*. W związku z tym wysunięto twierdzenie, że można je jedynie otrzymać z przypadków klinicznych (Barber i Rozwadowska-Dowzenko 1948, Barber 1947). Doniesienia o otrzymywaniu tworzących penicylinazę kolonii gronkowca z niepenicylinazotwórczych *in vitro* (Bellamy i Klimek 1948b, Szybalski 1953a, Gould 1955), wzbudzały zastrzeżenia (Barber 1956) ze względu na to, że nie została wykazana identyczność szczepów penicylinazotwórczych ze szczepem wyjściowym. O otrzymaniu szczepów penicylinazotwórczych *in vitro* z wrażliwych o tym samym fagotypie, doniosła również Barber (1956). Szczepy te, uzyskane w wyniku wielokrotnych przesiewów na podłoża z subletalnymi stężeniami antybiotyku, wykazywały jednak znacznie niższą aktywność penicylinazową, niż szczepy otrzymywane z przypadków klinicznych.

W związku z tym wysuwa się zagadnienie pochodzenia szczepów penicylinazotwórczych. Wysunięto kilka hipotez:

1. Szczepy penicylinazotwórcze gronkowca są mutantami o bardzo małej częstości mutacji, stąd trudność ich uzyskania *in vitro* (Szybalski 1953a, Barber i Burston 1955).

2. Szczepy penicylinazotwórcze są formami dzikimi, występującymi w przyrodzie, z których w organizmie ludzkim wyselekcjonowały się formy niepenicylinazotwórcze powstałe na drodze mutacji defektywnej. Wprowadzenie do terapii penicyliny stworzyło w organizmie ludzkim środowisko korzystne selekcyjnie dla form penicylinazotwórczych, stąd coraz częstsze ich występowanie (Barber 1947, Fairbrother 1956). Trudność uzyskania penicylinazotwórczych szczepów *in vitro* związana jest z tym, że zatrata danej cechy jest łatwiejsza niż jej odzyskanie. Na poparcie tej koncepcji przytaczane są wyniki badań nad występowaniem szczepów penicylinazotwórczych w drogach oddechowym ludności okolic, w których penicylina nie była jeszcze stosowana oraz wśród szczepów muzealnych, wyizolowanych przed wprowadzeniem penicyliny do terapii (Rountree 1956).

3. Badania Barber (1957), w których aktywność penicylinazowa tworzących ten enzym szczepów narastała w miarę hodowli na podłożach z subletalnymi stężeniami penicyliny, jak i wyniki badań Lippmana i Cohena (1958) pozwalają przypuszczać, że pewną rolę w powstawaniu tego enzymu mogą odgrywać procesy adaptacyjne.

Najwięcej danych przemawia za mutacyjnym pochodzeniem penicylinazotwórczych szczepów. Należy tu przede wszystkim mutacyjny zanik zdolności tworzenia penicylinazy, pod wpływem podwyższonej temperatury (45°) (Bondi, Kornblum i St. Phalle 1953), lub starzenia się hodowli, jak i ich rewersja do form penicylinazotwórczych (Fairbrother 1956).

Wzrastająca częstość występowania form penicylinazotwórczych wraz z zastosowaniem penicyliny w lecznictwie (Barber i Rozwadowska-Dowzenko 1948, Barber 1949b, Forbes 1949, Boe i Vogelsang 1949) oraz pojawianie się tego typu szczepów w coraz to większej ilości typów fagowych, wskazuje raczej na ich powstawanie w organizmie (Barber i Burston 1955).

Trudność uzyskania penicylinazotwórczych szczepów *in vitro* może być wynikiem niewielkiej różnicy w wrażliwości na penicylinę między komórką tego typu mutanta a komórką wrażliwego szczepu macierzystego. Dlatego pozytywne wyniki prób otrzymania szczepów penicylinazotwórczych osiągano albo przy zastosowaniu płytek gradientowych, albo też na subletalnych stężeniach penicyliny, gdzie selekcja nie mogła odgrywać większej roli.

Powstawanie penicylinazotwórczych szczepów w organizmie pod wpływem terapii penicylinowej może być wynikiem różnych warunków selekcyjnych. Z jednej strony stężenie penicyliny w narządach i komórkach organizmu może być stosunkowo niskie, umożliwiając penicylinazotwórczym mutantom przeżycie; z drugiej strony formy oporne niepenicylinazotwórcze są usuwane przez siły obronne organizmu.

W celu wyjaśnienia łatwej utraty penicylinooporności tego typu w porównaniu ze stosunkowo wolnym rozwojem *in vitro*, Hayes (1957) wysunął hipotezę, że za powstawanie penicylinazotwórczości odpowiedzialne są dwie mutacje, z których jedna warunkuje zdolność tworzenia penicylinazy w ogóle, druga zaś powstawanie indukcyjne dużej ilości tego enzymu. Za powstawanie form nie tworzących penicylinazy z tworzących ten enzym, jak i ich rewersję, odpowiedzialna byłaby mutacja tego pierwszego typu. Powstawanie form penicylinazotwórczych, takich jakie wyosobnia się z przypadków klinicznych, wymagałoby dwóch równoczesnych lub kolejnych mutacji, co jest zjawiskiem bardzo rzadkim.

GRONKOWCE TOLERUJĄCE PENICYLINĘ

Innego rodzaju problem stanowią szczepy gronkowca oporne na penicylinę, uzyskiwane *in vitro*. Oporność ich nie jest uwarunkowana wytwarzaniem penicylinazy. Nie stanowią też żadnego problemu klinicznego, gdyż w przypadkach chorobowych ze szczepami o tego typu oporności spotykamy się bardzo rzadko (Barber 1957).

Niemniej interesujące zagadnienie stanowi ich pochodzenie oraz mechanizm czy mechanizmy, warunkujące ich oporność.

Pierwszych badań nad genetycznym pochodzeniem opornych na penicylinę szczepów u gronkowca złocistego dokonał Demerec (1945, 1948). Stwierdził on, że po wysianiu wrażliwego na ten lek szczepu na podłoże z różnymi stężeniami penicyliny, przy pewnych koncentracjach przeżywa i tworzy kolonie 100% wysianych komórek. Po przekroczeniu jednak pewnego stężenia (koncentracji progowej) ilość form przeżywających gwałtownie maleje. Spadek ten przy pewnych stężeniach nieco łagodnieje. Przy jeszcze wyższych stężeniach (0.15 j/ml) nie przeżywa ani jedna bakteria, nawet po wysianiu największej praktycznie ich ilości. Formy przeżywające na wyższych stężeniach penicyliny są oporne co najmniej na stężenie, na którym wyrosły. Kolonie ich zawierają nieliczne bakterie tzw. oporne II stopnia, zdolne do wzrostu na stężeniach, na których hodowla wyjściowa nie wytwarzała opornych kolonii. Z form kolonii opornych II stopnia badacz ten otrzymywał formy oporne na jeszcze wyższe stężenia, tzw. oporne III stopnia itd. Uzyskane na tej drodze oporne szczepy zachowywały cechę tę mimo kilkakrotnych pasaży przez podłoża bez leku.

Na podstawie tych wyników Demerec doszedł do wniosku, że wyjściowa populacja bakterii wrażliwych jest niejednorodna. Składa się ona w ogromnej większości z form wrażliwych oraz nielicznych opornych. Formy oporne — to pierwszostopniowe mutanty, powstałe spontanicznie przed zetknięciem się bakterii z antybiotykiem. Na spontaniczne pochodzenie wskazywał z jednej strony fakt ich pojawiania się w hodowli powstałej w wyniku namnożenia się kilkudziesięciu bakterii. W tak małej populacji form opornych tego typu nie stwierdzono nigdy. Drugiego dowodu dostarczyły wyniki testu fluktuacyjnego, wskazujące na znacznie większe wahania w ilości form opornych między oddzielnymi hodowlami, niż w szeregu jednakowych próbek z jednej hodowli. W myśl interpretacji tego badacza, rozwój pełnej oporności na penicylinę odbywa się poprzez szereg stopni mutacyjnych jako wynik mutacji szeregu genów, których działalność sumuje się. Przyrost oporności z każdym stopniem jest eksponencjalny.

Odmiennie kształtuje się oporność na streptomycynę. W wypadku tym jeden z mutujących genów warunkuje pełną oporność na ten antybiotyk, inne zaś częściową, mniejszego lub większego stopnia.

Oba modele rozwoju lekooporności znalazły potwierdzenie w możliwości znalezienia formy w pełni opornej na streptomycynę już wśród form opornych I stopnia, czego nie stwierdza się w przypadku penicyliny (Klein 1947), oraz znacznie szybszym rozwoju oporności na streptomycynę niż na penicylinę (Klein 1947, Barbour 1950). Według modelu penicylinowego powstaje oporność na większość leków. Model streptomycynowy znajduje zastosowanie przy rozwoju oporności na izoniacyd.

Szczegółowe badania nad powstawaniem oporności na penicylinę u gronkowca wskazują, że jest to proces znacznie bardziej złożony. Przede wszystkim nie tylko w przypadku streptomycyny ale i penicyliny, pierwszostopniowe mutanty różnią się między sobą dość znacznie opornością, morfologią kolonii i pigmentacją (Mayr-Harting 1953). Na istnienie kilku typów pierwszostopniowych mutantów wskazują badania Barber (1953a). Dość trudny do zinterpretowania jest również fakt stopniowego spadku ilości form opornych w miarę wzrostu stężenia leku (Eagle, Fleishman i Levy 1952).

Z twierdzeniem, że w procesie rozwoju penicylinooporności występują wyraźne stopnie, nie zgadza się Hughes (1957). Wyraża on pogląd, że rozwój oporności odbywa się poprzez selekcję coraz to bardziej opornych osobników spośród heterogennej pod tym względem populacji. Samą tylko selekcją tłumaczą Klein i Kimmelmann (1947) zależność między stężeniem leku a opornością form na nim wyrastających.

Na podłożu płynnym z antybiotykiem obserwowano pojawianie się wtórnego wzrostu bakterii opornych po upływie 48 godzin, a nawet kilku dni. Przy pewnych stężeniach penicyliny zjawisko to występowało nawet wówczas, gdy ilość bakterii, którą zaszczepiono podłoże z antybiotykiem, wykluczała preegzystencję mutanta (Eriksen 1949, Banic 1954).

W oparciu o te fakty część badaczy wypowiada przypuszczenie, że formy oporne na penicylinę powstają też w wyniku kontaktu bakterii z lekiem (Eriksen 1949, Banic 1954), który działa jako nieswoisty mutagen (Briggs, Crawford, Abraham, Gladstone 1957). Możliwość mutagennego działania leku dopuszcza również Barber (1953c). Znane są też fakty indukcyjnego działania penicyliny na powstawanie form G u gronkowca (Wise i Spink 1954). Na możliwość mutagennego działania penicyliny wskazują wyniki badań cytochemicznych (Dufrenoy i Pratt 1947a, b, 1948), świadczące o wpływie tego antybiotyku na potencjał „redoks" komórek bakteryjnych i na meta-

bolizm RNA. Istnieje też możliwość udziału procesów adaptacyjnych w powstawaniu oporności na penicylinę *in vitro*. Barber (1953c) otrzymała formy oporne na penicylinę, u których rozwój oporności, jak i jej zatrata, odbywały się w sposób ciągły. Pogląd ten podziela Banic (1958), któremu wprawdzie przy pomocy metody replik udało się otrzymać klony oporne na niskie stężenia penicyliny bez kontaktu z antybiotykiem, jednak oporność nie obejmowała 100% bakterii. Zdaniem tego badacza, formy oporne na penicylinę należy uważać za „lasting modifications" mutacyjnego pochodzenia, których oporność rozwija się w procesie adaptacji.

Różne możliwe sposoby powstawania form opornych na penicylinę nie wykluczają się nawzajem. Przypuszczenie, że penicylina może zwiększać częstość mutacji w ogóle, a w ich liczbie i mutacji warunkujących penicylinooporność, nie wyklucza możliwości powstawania takich mutantów spontanicznie, czyli pod wpływem czynników nie kontrolowanych. Z drugiej strony charakter rozwoju oporności dopuszcza udział w tym pewnych procesów adaptacyjnych. Znajduje to pewne uzasadnienie w sposobie działania penicyliny i w różnorodności mechanizmów warunkujących oporność.

MECHANIZM DZIAŁANIA PENICYLINY

Zagadnienie jak penicylina działa na wrażliwe na nią bakterie było przedmiotem licznych badań od chwili wprowadzenia tego leku do terapii. Wysunięto szereg hipotez co do możliwych dróg działania penicyliny i związanych z tym mechanizmów warunkujących oporność. Problem ten nie jest jednak nadal rozwiązany.

Główne fakty związane z działaniem penicyliny stwierdzono dość wcześnie. Penicylina działa na wrażliwe na nią bakterie bakteriobójczo tylko w warunkach umożliwiających normalny wzrost (Hobby i Dawson 1944a i b, Chain i Duthie 1945). W związku z tym nie zabija ona form spoczynkowych (Barnes 1947) bakterii, poddanych jej działaniu w temperaturze niższej aniżeli temperatura minimalna dla ich rozwoju, oraz mutantów defektywnych na podłożu bez wymaganego przez nie czynnika wzrostowego. Szybkość zabijania gronkowca przez penicylinę jest tym większa, im szybsze jest tempo wzrostu. Po przekroczeniu jednak temperatury optymalnej dla wzrostu, szybkość śmierci pod wpływem penicyliny nadal wzrasta (Lee i Foley 1945).

Najsilniej działa ona na bakterie będące w logarytmicznej fazie wzrostu. Bakterie poddane jej działaniu, przy niższych stężeniach leku zwykle dzielą się kilkakrotnie, po czym wzrost ich ulega zatrzymaniu (Chain i Duthie 1945, Hobby i Dawson 1944c). Towarzyszy

temu spadek pobierania tlenu, pęcznienie komórek, ich śmierć i autoliza. Procesy te zachodzą tym szybciej im młodsza była hodowla; śmierć 99% komórek ma miejsce już po upływie 5-7 godzin. Niemniej jednak przy pewnych stężeniach nawet po upływie 24 godzin stwierdza się jeszcze nieliczne żywe komórki. Stwierdzono jednak, że „persisters" są tak samo wrażliwe na penicylinę jak szczep wyjściowy (Rantz i Kirby 1944). Natychmiastowe przeniesienie bakterii, których podziały uległy zahamowaniu, do środowiska bez penicyliny, umożliwia dalsze podziały poprzedzane wtórną fazą zastoju (Parker i Luse 1948). Przy niższych stężeniach antybiotyku obserwuje się również wtórny wzrost na podłożu z penicyliną (Hobby i Dawson 1944c).

Bakterie poddane działaniu penicyliny wykazują zmiany cytochemiczne, charakterystyczne dla zaniku grup *SH*. Na tej podstawie jedna z wcześniejszych hipotez tłumaczy bezpośrednie bakteriobójcze działanie tego antybiotyku zablokowaniem grup *SH* (Duffrenoy i Pratt 1947a i b), zarówno u bakterii gramdodatnich jak i gramujemnych. Różnice polegałyby na stężeniach progowych (Pratt i Duffrenoy 1947). Hipoteza ta nie tłumaczy dużej swoistości działania penicyliny. Zanik grup *SH* powodowany jest przez wiele innych bakteriostatycznych i bakteriobójczych substancji. Dlatego wysuwane jest zastrzeżenie, czy rzeczywiście jest to pierwszy skutek działania penicyliny, a nie wtórny. Stwierdzono również, że zahamowanie wzrostu spowodowane działaniem penicyliny nie ulega odwróceniu po wprowadzaniu do hodowli cysteiny, co ma miejsce w przypadku działania gliotoksyny lub $CuCl_2$ (Bailey i Cavallito 1948).

Nie stwierdzono działania penicyliny na fosfatazy bakteryjne (Baylis, Gluck i Siem 1948).

Inne wytłumaczenie mechanizmu działania penicyliny dostarczyły badania Gale'a (1947, 1953). Badacz ten stwierdził, że bakteriobójcze stężenia penicyliny uniemożliwiają gronkowcom pobieranie z podłoża kwasu glutaminowego. Równocześnie z rozwojem oporności, mikroorganizm ten nabywa zdolność syntezy wielu aminokwasów, a w ich liczbie i kwasu glutaminowego z glikozy i soli amonowych (Gale i Rodwell 1948). Z faktów tych badacz ten wysnuł przypuszczenie, że mechanizm działania penicyliny polega na zahamowaniu asymilacji kwasu glutaminowego.

Tłumaczenie to nie obejmuje jednak wszystkich przypadków działania penicyliny. Stwierdzono bowiem, że *Bacillus subtilis*, mikroorganizm zdolny do syntezy wszystkich aminokwasów z glikozy i soli amonowych, jest równie silnie hamowany przez penicylinę na podłożu mineralnym jak i na agarze odżywczym (Hunter i Baker 1949, Greelet 1949). Podjęto też próbę połączenia tych dwu hipotez, czego wyrazem

była koncepcja, że zanik grup *SH* powoduje obniżenie aktywności oddechowej, a tym samym osłabienie procesów wymagających energii, do których należy pobieranie aminokwasów z podłoża (Duffrenoy i Pratt 1947b). Również Hotchkiss (1950) wyraża pogląd, że spadek w pobieraniu kwasu glutaminowego pod wpływem penicyliny u gronkowców jest wynikiem obniżenia intensywności procesów oddechowych. Obserwował on natomiast spadek syntezy białek przy równoczesnym nagromadzaniu się w środowisku jakiegoś polipeptydu.

Liczne badania wykazały wpływ penicyliny na metabolizm nukleotydów (Gros i Macheboeuf 1949). Znajduje w nich uzasadnienie zmiana barwliwości metodą Grama bakterii poddanych działaniu tego antybiotyku.

Nowe światło na mechanizm działania penicyliny rzuciły badania nad jej adsorpcją na wrażliwych bakteriach (Maas i Johnson 1949a i b, Rowley, Cooper, Roberts i Smith 1950). Wykazały one, że bakterie wiążą swoiście stałe ilości penicyliny, niezależnie od jej stężenia w środowisku. Adsorpcja penicyliny ma charakter trwały i antybiotyk nie ulega wymyciu. Intensywność jej wzrasta w czasie podziałów komórkowych. Dalsze badania nad tym zagadnieniem wykazały, że wewnętrzne bakteriobójcze stężenia penicyliny w komórkach bakterii różniących się znacznie wrażliwością wykazują nieznaczne różnice. Wrażliwość na penicylinę byłaby więc funkcją powinowactwa do tego antybiotyku wiążącej go komponenty. Nie jest to związane z różnicami w przepuszczalności ściany komórkowej, gdyż ekstrakty komórek zachowywały się podobnie (Few, Cooper i Rowley 1952, Eagle 1954a, 1954b).

Odpowiedni stopień powiązania penicyliny z wiążącą ją komponentą komórkową nie jest jedynym warunkiem bakteriobójczego działania penicyliny. Bakterie muszą znajdować się w środowisku umożliwiającym namnażanie się, a antybiotyk musi być stale w nim obecny (Eagle 1954a).

Komponenta wiążąca penicylinę została zlokalizowana w ścianie komórkowej (Few, Cooper i Rowley 1952).

Wyniki tych badań wykazują pewną zbieżność z rezultatami badań Parka i Stromingera (1957) nad pierwszym punktem działania penicyliny. Badacze ci stwierdzili nagromadzanie się w komórkach, poddanych działaniu penicyliny, urydyno-5-fosforanu połączonego z N-acetyloaminocukrem i peptydem złożonym z kwasu glutaminowego, d-lizyny i dl-alaniny w stosunku 1 : 1 : 3. Lizynę u pewnych bakterii zastępuje kwas dwuaminopimelinowy. Bardzo bliski związek czasowy między początkiem nagromadzania się tego kompleksu a momentem zadziałania penicyliny świadczył o bliskim powiązaniu tego zjawiska z pierwszym

efektem działania penicyliny. Wysunięto przypuszczenie, że związek ten jest prekursorem ściany komórkowej, gdyż stwierdzono w niej istnienie jego analogonu.

Penicylina blokowałaby albo enzym czynny w przenoszeniu kompleksu peptydowo-cukrowego z urydynofosforanu na receptory w ścianie komórkowej, albo też same receptory.

Hipoteza tłumacząca mechanizm działania penicyliny interferencją tego antybiotyku z biosyntezą ściany komórkowej pokrywa się w pewnym sensie z obserwacjami Gale'a, z badaniami Prestige i Bardee (1957) nad działaniem penicyliny na barierę osmotyczną komórki, wreszcie z obserwacjami nad powstawaniem protoplastów pod wpływem działania tego antybiotyku (Hahn i Clark 1957), uważanych przez Lederberga (1957) za odpowiedniki dużych ciał w cyklu *L*.

Wyniki dotychczasowych badań nad mechanizmem działania penicyliny wskazują bardzo wyraźnie na jego złożoność. Penicylina przy różnych stężeniach może działać na różne procesy. Możliwość tę wysunął Eagle (1951, 1954c), w związku ze zjawiskiem zonalności.

MECHANIZM OPORNOŚCI NA PENICYLINĘ

Przy tak niepełnych wiadomościach o chemizmie bakteriobójczego działania penicyliny, również i znajomość procesów biochemicznych, warunkujących oporność, w większości wypadków nie wykracza poza ramy spekulacji. Spośród licznych możliwych mechanizmów, warunkujących oporność na penicylinę, dwa, a mianowicie wytwarzanie endogennej lub egzogennej penicylinazy, w wielu przypadkach zostały stwierdzone bezspornie. Jednakże nawet i u penicylinazotwórczych bakterii może działać dodatkowy mechanizm, warunkujący oporność (Bondi i Dietz 1944, Parker 1946). Niektóre przypadki różnic w wrażliwości na penicylinę można tłumaczyć niskim powinowactwem tego antybiotyku do wiążącej go komponenty komórkowej (Eagle 1954a). Mechanizm ten nie tłumaczy wzrostu oporności szczepów trenowanych do penicyliny *in vitro*. W pewnych przypadkach obserwuje się tu spadek reaktywności wiążącej penicylinę komponenty, w innych wzrost reaktywności (Eagle 1954b i c). Wreszcie rozwój oporności u gronkowca może zachodzić w wyniku uniezależniania się tego drobnoustroju od obecności w podłożu gotowych aminokwasów (Gale i Rodwell 1949). Mechanizm ten jest tym bardziej prawdopodobny, że gronkowce równie łatwo dają się trenować do wzrostu na podłożu bezaminokwasowym, jak i na podłożu z penicyliną. Gronkowce zdolne do wzrostu na podłożu bez aminokwasów nie tworzą koagulazy i hemolizyny (Gladstone 1937), co stwierdza się również u szczepów opornych na penicylinę. Wreszcie gronkowce

wytrenowane do syntezy wszystkich wymaganych aminokwasów okazały się oporne na penicylinę.

Wymienione mechanizmy nie tłumaczą wszystkich przypadków powstawania oporności. Dotyczy to szczególnie form opornych uzyskiwanych *in vitro*.

Formy te w procesie rozwoju oporności ulegają znacznym zmianom, obejmującym morfologię, wymagania odżywcze, właściwości biochemiczne itp. Rozwojowi oporności u gronkowca towarzyszy zanik pigmentacji (Graessle i Frost 1946, Blair, Carr i Buchman 1946, Klimek, Cavallito i Bailey 1948), wolniejsza fermentacja węglowodanów lub jej zanik (Graessle i Frost 1946, Blair i współpracownicy 1946, Bellamy i Klimek 1947, 1948a). Szczepy oporne uzyskane *in vitro* wykazują zwykle zmniejszoną zjadliwość, wolniejsze tempo wzrostu i metabolizmu (Blair i współpracownicy 1946) oraz tendencję do przechodzenia w fazę *R* (Rake, McKee, Hamre i Houck 1944). Opisywano także spadek toksynogenności (Spink, Ferris i Vivino 1944). Zjawiska te tłumaczą małe znaczenie kliniczne szczepów opornych tego typu. Z drugiej strony zwolniony metabolizm stanowić może jedną z przyczyn zmniejszonej wrażliwości na penicylinę.

Obok nabywania zdolności syntezy wszystkich wymaganych do życia aminokwasów w miarę rozwoju penicylinooporności (Gale i Rodwell 1948), a nawet zdolności syntezy kwasu nikotynowego (Bellamy i Klimek 1948b), obserwowano u gronkowca złocistego zanik wzrostu w warunkach beztlenowych (Bellamy i Klimek 1947, 1948a). Silne zmiany w metabolizmie, związane z rozwojem oporności, mogą być przyczyną częstych przypadków oporności krzyżowej, opisywanych m. in. przez Graessle i Frosta (1946), Klimka, Cavallito i Baileya (1948), Szybalskiego (1953b).

Bardzo częstym zjawiskiem związanym z rozwojem penicylinooporności jest zmiana barwliwości metodą Grama. Szczepy oporne na penicylinę barwią się niekiedy gramujemnie. Briggs, Crawford i Abraham (1957) opisują przekształcanie się gronkowca złocistego pod wpływem penicyliny w pałeczki gramujemne, różniące się od form wyjściowych pigmentacją, zdolnościami fermentacyjnymi, wykazujące odmienny fagotyp, zanik koagulazotwórczości, zdolności wzrostu na agarze z 10-procentowym NaCl. Część z nich dawała rewersję do form wyjściowych. Możliwość powstawania pod wpływem penicyliny tak daleko idących zmian wydaje się jednak dość wątpliwa.

Z tego krótkiego przeglądu zasadniczych prac nad zagadnieniami związanymi z penicylinoopornością wynika, że szereg problemów stanowi nadal zagadkę. Dotyczy to przede wszystkim mechanizmu działania

penicyliny. Wobec silnego wzajemnego powiązania procesów metabolicznych w komórce bakteryjnej, zaburzenia wywołane w jednym z nich interferują z innymi. Stąd też poszukiwania procesu uszkadzanego działaniem penicyliny wykazały, że procesów tych jest wiele. Powstaje pytanie, które z nich są pierwszym punktem ataku penicyliny, a które skutkami wtórnymi. Jedyną drogą rozwiązania, wobec trudności uzyskania *in vitro* zahamowanego systemu enzymatycznego, stanowią metody pośrednie — poszukiwanie antagonisty penicyliny, nagromadzającego się metabolitu na skutek bloku, czy wreszcie porównywanie szczepów opornych z wrażliwymi. Ten ostatni sposób wiąże się z drugim ważnym, a nie rozwiązanym problemem mechanizmu warunkującego oporność. Dotyczy to szczepów opornych, uzyskiwanych *in vitro*. Oporność szczepów penicylinazotwórczych jest bowiem w zasadzie uwarunkowana wytwarzaniem penicylinazy. Szczepy penicylinozależne opisane po raz pierwszy przez Barber (1953a), zawdzięczają penicylinozależność zdolności benzylpenicyliny i niektórych produktów jej degradacji do zastępowania tiaminy w charakterze czynnika wzrostowego (Markow i Saev wg. Eleka 1959). Liczne obserwacje nad zmianami w metabolizmie penicylinoopornych niepenicylinazotwórczych gronkowców wskazują, że szereg przyczyn może wywołać zwiększenie się oporności na ten antybiotyk. Może to wskazywać, że oporność na penicylinę powstaje nie tylko przez mutację spontaniczną, ale i w wyniku pewnych procesów adaptacyjnych, zwłaszcza że nie wykluczają się one wzajemnie.

Autor korzysta ze sposobności, by podziękować prof. drowi Wł. Kunickiemu-Goldfingerowi, kierownikowi Zakładu, za pomoc, radę i kierunek przy wykonywaniu niniejszej pracy.

LITERATURA

Alexander H. E., Leidy G., 1953: Induction of streptomycin-resistance in sensitive *Haemophilus influenzae* by extracts containing desoxyrybonucleic acid from resistant *Haemophilus influenzae*. *J. exp. Med.*, **97**: 17.

Bailey J. H., Cavallito C. J., 1948: The reversal of antibiotic action. *J. Bact.*, **55**: 175.

Banic S., 1954: Über der Rolle der Adaptation bei der Entstehung der bakteriellen Resistenz gegen Chemotherapeutica. *Schweiz. Ztschr. allg. Path. Bakt.*, **17**: 183.

Banic S., 1958: Isolation by replica plating technique of the mutant of *Staphylococcus aureus* partially resistant to low concentration of penicillin. *Schweiz. Ztschr. allg. Path. Bakt.*, **21**: 54.

Barber M., 1947: Coagulase positive staphylococci resistant to penicillin. *J. Path. Bact.*, **59**: 373.

Barber M., 1949a: The incidence of penicillin-sensitive variant colonies in penicillinase-producing strains of *Staphylococcus aureus*. *J. gen. Microbiol.*, 3: 274.

Barber M., 1949b: Bacteriophages types in penicillin-resistant staphylococcal infection. *Brit. med. J.*, 2: 565.

Barber M., 1953a: Penicillin-resistant and penicillin-dependent staphylococcal variants. *J. gen. Microbiol.*, 8: 111.

Barber M., 1953b: The effect of serial passage in other antibiotics on penicillinase-producing staphylococci. *J. gen. Microbiol.*, 8: 104.

Barber M., 1953c: Antibiotic resistant staphylococcal variants. Adaptation in microorganisms. *Third Symp. Soc. Gen. Microbiol.*: 235. Cambridge Univ. Press.

Barber M., 1956: Penicillin-destroying variants from penicillin-sensitive staphylococci. *J. gen. Microbiol.*, 14: 111.

Barber M., 1957: Drug resistance of staphylococci with special reference to penicillinase production. Drug resistance in microorganisms. Ciba Foundation Symposium. 262-279. Churchill Ltd., London.

Barber M., Burston J., 1955: Antibiotic-resistant staphylococcal infection. A study of antibiotical sensitivity in relation to bacteriophage types. *Lancet*; 2: 578.

Barber M., Rozwadowska-Dowzenko M., 1948: Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet*, 2: 641.

Barbour R. G. H., 1950: The development of resistance to streptomycin by *Staphylococcus pyogenes*. *Austr. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 28: 415.

Barnes J. M., 1947: Penicillin and *Bacillus anthracis*. *J. Path. Bact.*, 59: 113.

Bayliss M., Glick D., Siem R. A., 1948: Demonstration of phosphatases and lipase in *Bacteria* and true fungi by staining methods and the effect of penicillin on phosphatase activity. *J. Bact.*, 55: 307.

Bellamy W. D., Klimek J. W., 1947: The relation between induced resistance to penicillin and oxygen utilisation. *J. Bact.*, 53: 374.

Bellamy W. D., Klimek J. W., 1948a: The relation between induced resistance to penicillin and oxygen utilisation. *J. Bact.*, 55: 147.

Bellamy W. D., Klimek J. W., 1948b: Some properties of penicillin-resistant staphylococci. *J. Bact.*, 55: 153.

Blair J. E., Carr M., Buchman J., 1946: The action of penicillin on staphylococci. *J. Immunol.*, 52: 281.

Bondi A., Dietz C. C., 1944: Relationship of penicillinase to the action of penicillin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 56: 135.

Bondi A., Dietz C. C., 1945: Penicillin-resistant staphylococci. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 60: 55.

Bondi A., Dietz C. C., 1946: Bacterial penicillinase production, nature and origin. *J. Bact.*, 51: 125.

Bondi A., Dietz C. C., 1948: The susceptibility of penicillinase producing bacteria to penicillin. I. Factor influencing susceptibility. *J. Bact.*, 55: 843.

Bondi A., Kornblum J., St. Phalle M. de, 1953: Isolation of penicillin-susceptible mutants from penicillinase-producing strains of *Micrococcus pyogenes*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 83: 527.

Bondi A., St. Phalle M. de, Kornblum J., Moat A. G., 1954: Factors influencing the synthesis of penicillinase by *Micrococcus pyogenes*. *Arch. Biochim.*, 53: 348.

Bondi A., Kornblum J., St. Phalle M. de, 1954: The aminoacid requirement of penicillin-resistant and penicillin-sensitive strains of *Micrococcus pyogenes*. *J. Bact.*, 68: 617.

Boe J., Vogelsang T. M., 1949: Penicillin-resistant pathogenic staphylococci isolated from upper respiratory tract. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **26**: 71.

Bretani G., 1951: Method for detection of mutation using streptomycin-dependence in *E. coli. Genetics*, **36**: 598.

Briggs S., Crawford K., Abraham E. P., Gladstone G. P., 1957: Some properties of gram-negative bacilli obtained from a strain of *Staphylococcus aureus* in presence of benzylpenicillin. *J. gen. Microbiol.*, **16**: 614.

Bronschein H., Dittrich W., Höhne G., 1951: *Naturwissenschaften*, **38**: 383.

Bryson V., Szybalski W., 1952: Microbial selection. *Science*, **116**: 45.

Bryson V., Szybalski W., 1955: Microbial drug resistance. *Adv. Genetics*, **7**: 1.

Cavalli-Sforza L. L., 1952: Genetic analysis of drug resistance. *Bull. World Health Org.*, **6**: 185.

Cavalli-Sforza L. L., 1957: Indirect selection and drug resistance. Drug resistance in microorganisms. Ciba Symposium. 30-46. J. a. A. Churchill Ltd. London.

Cavalli-Sforza L. L., Maccacaro G. A., 1950: Chloromycetine resistance in *E. coli.* A case of quantitative resistance in bacteria. *Nature*, **166**: 991.

Cavalli-Sforza L. L., Maccacaro C. A., 1952: Polygenic inheritance of drug resistance in the bacterium *E. coli. Heredity*, **6**: 311.

Cavalli-Sforza L. L., Lederberg J., 1953: Genetics of resistance to bacterial inhibitors. Symposium: Growth inhibition and chemotherapy: 99-142. Roma, 1953.

Cohn M., Monod J., 1953: Inhibition and induction of enzyme biosynthesis. Adaptation in microorganisms. *Third Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 132-149. Cambridge University Press, Cambridge.

Chain E., Duthie E. S., 1945: Bacteriocidal and bacteriolytic action of penicillin. *Lancet*, **1**: 652.

Dean A. C. R., 1955: Mechanism of resistance to proflavine in *Bacterium lactis aerogenes*. W: Origine of resistance to toxic agents. Ed., Sevag. M. G., Reid R. D., Reynolds O. E., New York. Academic Press.

Dean A. C. R., Hinshelwood C., 1952: Resistance of *Bacterium lactis aerogenes* to proflavine. The applicability of the statistical fluctuation test. *Proc. Roy. Soc., B*, **139**: 236.

Dean A. C. R., Hinshelwood C., 1953: Observations on bacterial adaptation. Adaptation in microorganisms. *Third Symp. Soc. gen. Microbiol.*: 21-45. Cambridge University Press, Cambridge.

Dean A. C. R., Hinshelwood C., 1957: Aspects of problem of drug resistance in bacteria. Drug resistance in mocroorganisms. 4-29. J. A. Churchill Ltd., London.

Demerec M., 1945: Production of staphylococcal strains resistant to various concentration of penicillin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **31**: 16.

Demerec M., 1948: Origin of bacterial resistance to antibiotics. *J. Bact.*, **56**: 63.

Demerec M., 1951: Studies in streptomycin-resistance system of mutation in *E. coli. Genetics*, **36**: 586.

Demerec M., 1957: Genetic aspects of drug resistance. Drug resistance in microorganisms. Ciba Symposium; 47-63. J. A. Churchill Ltd., London.

Dietz C., Bondi A., 1948: The susceptibility of penicillinase producing bacteria to penicillin. II. The effect of sodium azide. *J. Bact.*, **55**: 849.

Duffrenoy J., Pratt R., 1947a: Cytochemical mechanism of penicillin action. I. Oxidation-reduction levels. *J. Bact.*, **53**: 657.

Duffrenoy J., Pratt R., 1947b: Cytochemical mechanisms of penicillin action. III. Effect on the reaction to the Gram stain in *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.*, **54**: 283.

Duffrenoy J., Pratt R., 1948: Cytochemical mechanisms of penicillin action. V. Comparative effect of ribonuclease, cobra venom and penicillin on susceptible bacteria. *J. Bact.*, **55**: 525.

Eagle H., 1951: Further observation on some phenomena in bacteriocidal action of penicillin. *J. Bact.*, **62**: 663.

Eagle H., 1954a: The binding of penicillin in relation to its cytotoxic action. I. Correlation between penicillin sensitivity and combined activity of intact bacteria and cell-free extracts. *J. exp. Med.*, **99**: 207.

Eagle H., 1954b: The binding of penicillin in relation to its cytotoxic action. II. The reactivity with penicillin of resistant variants of streptococci, pneumococci and staphylococci. *J. exp. Med.*, **100**: 103.

Eagle H., 1954c: The multiple mechanisms of penicillin-resistance. *J. Bact.*, **68**: 610.

Eagle H., Fleischman R., Levy M., 1952: Development of increased bacterial resistance to antibiotics. I. Continuous spectrum of resistance to penicillin, chloramphenicol and streptomycin. *J. Bact.*, **63**: 623.

Elek S. D., 1959: *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. E. a. S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London.

Ephrussi B., Hottinguer H., 1951: Cytoplasmic constituent of heredity. On an unstable cell state in yeasts. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **16**: 75.

Eriksen K. R., 1949: Studies on the mode of origine of penicillin-resistant staphylococci. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **26**: 269.

Eriksen K. R., 1953: On the validity of the fluctuation test in the studies of the mode of origine of penicillin-resistant staphylococci. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **32**: 393.

Eriksen K. R., Hansen D., 1954: Observation on the extracellular nature of staphylococcal penicillinase. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **35**: 169.

Few A. V., Cooper P. D., Rowley D., 1952: Reaction of penicillin with the staphylococcal cell wall. *Nature*, **169**: 283.

Forbes G. B., 1949: Infection with penicillin-resistant staphylococci in hospital and general practice. *Brit. Med. J.*, *569*.

Fairbrother R. W., 1956: Mixed staphylococcal infections. The development of penicillin-resistant strains. *Lancet*,: 716.

Gale E. F., 1947: Correlation between penicillin-resistance and assimilation affinity in *Staphylococcus aureus*. *Nature*, **160**: 407.

Gale E. F., 1953: The action of antibiotics on the incorporation of glutamic acid into the proteins of *Staphylococcus aureus*. *J. gen. Microbiol.*, **8**: vii.

Gale E. F., Rodwell A. W., 1948: Amino-acid metabolism of penicillin-resistant staphylococci. *J. Bact.*, **55**: 161.

Gale E. F., Rodwell A. W., 1949: The nature of resistance to penicillin in *Staphylococcus aureus*. *J. gen. Microbiol.*, **3**: 127.

Gilson B. St. C., Parker R. F., 1948: Staphylococcal penicillinase, characteristic of the enzyme and its distribution. *J. Bact.* **55**: 801.

Gladstone G. P., 1937: The nutrition of *Staphylococcus aureus*. Nitrogen requirements. *Brit. J. exp. Path.*, **18**: 322.

Gots J. S., 1945: Production of extracellular penicillin inactivating substance associated with penicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **60**: 165.

Graessle O. E., Frost B. M., 1946: Induced in vitro resistance of staphylococci to streptomycin and penicillin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **63**: 171.

Greelet N., 1949: Activé comparée de la penicilline sur la croissance de *Bacillus subtilis* en milieu synthetique ammoniacal et la milieu peptoné. *Ann. Inst. Pasteur.*, **77**: 263.

Gros F., Macheboeuf M., 1949: Considerations biochimiques sur le mode d'action de la penicilline. *Ann. Inst. Pasteur*, **77**: 127.

Gould J. C., 1955: Origine of penicillin-resistant *Staphylococcus pyogenes*. *Nature*, **176**: 176.

Hahn F. E., Clark J., 1957: Penicillin induced lysis in *E. coli*. *Science*, **125**: 119.

Hayes W., 1957: Głos w dyskusji. Drug resistance in microorganisms. Ciba Foundation Symposium 275. J. A. Churchill Ltd. London.

Hinshelwood C. M., 1946: The chemical kinetics of bacterial cell. Oxford Univ. Press.

Hobby G. L., Dawson M. H., 1944a: Effect of rate of growth of bacteria on action of penicillin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **56**: 181.

Hobby G. L., Dawson M. H., 1944b: The relationship of penicillin to sulfonamide action. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **56**: 184.

Hobby G. L., Dawson M. H., 1944c: Bacteriostatic action of penicillin on hemolytic streptococci *in vitro*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **56**: 178.

Housewright R. D., Henry R. J., 1947: Studies on penicillinase. III. The effect of antipenicillinase on penicillin-resistant organisms. *J. Bact.*, **51**: 241.

Hotchkiss R. D., 1950: The abnormal course of bacterial protein synthesis in the presence of penicillin. *J. exp. Med.*, **91**: 351.

Hotchkiss R. D., 1951: Transfer of penicillin resistance by desoxyribonucieate derived from resistant cultures. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **16**: 457.

Hughes W. H., 1957: Inheritance in single bacterial cell. Drug resistance in microorganisms. Ciba Foundation Symposium; 64-77. J. A. Churchill Ltd., London.

Hunter T. H., Baker K. T., 1949: The action of penicillin on *Bacillus subtilis* growing in the absence of amino-acids. *Science*, **110**: 423.

Kirby W. M. M., 1945: Bacteriostatic and lytic actions of penicillin on sensitive and resistant staphylococci. *J. Clin. Invest.*, **24**: 165.

Klein N., 1947: A mechanism for the development of resistance to streptomycin and penicillin. *J. Bact.*, **53**: 463.

Klein N., Kimmelman L., 1947: The correlation between the inhibition of drug resistance and synergism in streptomycin and penicillin. *J. Bact.*, **54**: 363.

Klimek J. W., Cavallito C. J., Bayley J. H., 1948: Induced resistance of *Staphylococcus aureus* to various antibiotics. *J. Bact.*, **55**: 139.

Kunicki-Goldfinger W., 1954. Zmienność u bakterii. *Acta Microbiol. Polon.*, **3**: 199.

Lachowicz T. M., 1960: The mechanism of development *in vitro* of penicillin-resistant variant of *Staphylococcus aureus*. II. Further investigation on the fluctuation test in the study of origin of penicillin-resistance. *Acta Microbiol. Polon.* **9**: 143.

Lederberg J., 1957: Mechanism of action of penicillin. *J. Bact.*, **73**: 144.

Lederberg J., Lederberg E. M., 1952: Replica plating and indirect selection

of bacterial mutants. *J. Bact.*, **63**: 399.

Lee S. W., Foley E. J., 1945. Effect of temperature on the action of penicillin *in vitro*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **60**: 133.

Linz R., 1950: Sur le mechanisme de l'action de la *Streptomycine*. II. La resistance á la streptomycine. *Ann. Inst. Pasteur*, **78**: 233.

Lippman G. H., Cohen S., 1957: Induction of staphylococcal penicillinase. *J. Bact.*, **73**: 28.

Lippman G. H., Cohen S., 1958: Further evidence for inducibility of staphylococcal penicillinase. *J. Bact.*, **76**: 117.

Luria S. E., Delbrück M., 1943: Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, **28**: 491.

Maass E. A., Johnson M. J., 1949a: Penicillin uptake by bacterial cells. *J. Bact.*, **57**: 415.

Maass E. A., Johnson M. J., 1949b: The relations between bound penicillin and growth in *Staphylococcus aureus*. *J. Bact.*, **58**: 361.

Mayr-Harting A., 1955: The acquisition of penicillin-resistance by *Staphylococcus aureus* strain *Oxford*. *J. gen. Microbiol.*, **13**: 9.

Newcombe H. B., 1949: Origine of bacterial variants. *Nature*, **164**: 150.

Newcombe H. B., 1955: Spontaneous and induced mutation to drug resistance in *E. coli*. Origine of resistance to toxic agents. 4-19. ed. M. G. Sevag, R. D. Reid and E. D. Reynolds. Academic Press N. Y.

Newcombe H. B., Hawirko R., 1949: Spontaneous mutation to streptomycin-resistance and dependence in *E. coli*. *J. Bact.*, **57**: 565.

Park J. T., Strominger J. L., 1957: Mode of action of penicillin. *Science*, **125**: 99.

Parker R. F., 1946: Action of penicillin on staphylococcus. Effect of size of inoculum on the test of sensitivity. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **63**: 443.

Pollock M. R., 1953a: Stage in enzyme adaptation. Adaptation in microorganisms. *Third Symp. Soc. gen. Microbiol.*: 150-183. Cambridge Univ. Press.

Pollock M. R., 1953b: Penicillinase adaptation and fixation of penicillin sulfur by *Bacillus cereus* spores. *J. gen. Microbiol.*, **8**: 186.

Pratt R., Duffrenoy J., 1947: Cytochemical mechanisms of penicillin action. IV. Comparative responses of Gram positive and Gram negative bacteria to penicillin. *J. Bact.*, **54**: 719.

Parker F. R., Luse S., 1948: The action of penicillin on staphylococci. Further observations on the effect of a short exposure. *J. Bact.*, **56**: 75.

Prestige L. S., Bardec A. B., 1957: Induction of bacterial lysis by penicillin. *J. Bact.*, **74**: 48.

Rake G., McKee C. M., Hamre D. M., Houck C. L., 1944: Studies on penicillin. Observation on therapeutic activity and toxicity. *J. Immunol.*, **48**: 271.

Rantz L. A., Kirby M. M., 1944: The action of penicillin on *Staphylococcus in vitro*. *J. Immunol.*, **48**: 335.

Rountree P. M., 1956: Staphylococci harboured by people in western highlands of New Guinea. *Lancet*, **1**: 719.

Rowley D., Cooper P. D., Roberts P. W., Lester Smith E., 1950: The site of action of penicillin. *Biochem. J.*, **46**: 157.

Ryan F. J., 1952: Adaptation to use lactose in *E. coli*. *J. gen. Microbiol.*, **7**: 69.

Sinai J., Yudkin J., 1959a: Origine of bacterial resistance to proflavine. III. The alleged rapid adaptation to proflavine resistance in *Bacterium lactis aerogenes*. *J. gen. Microbiol.*, **20**: 373.

Sinai J., Yudkin J., 1959b: Origine of bacterial resistance to proflavine. IV. Cycles of resistance in *E. coli* and their bearing on variation in resistance in culture. *J. gen. Microbiol.*, **20**: 384.

Sneath P. H., 1955: Proof of the spontaneity of a mutation to penicillinase production in *B. cereus. J. gen. Microbiol.*, **13**: 561.

Spink W. W., Ferris V., Vivino J. J., 1944: Comparative *in vitro* resistance of staphylococci to penicillin and to sodium sulfatiazole. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **55**: 207.

Szybalski W., 1953a: Natural and artifical resistance in *Staphylococcus (Micrococcus) pyogenes. Antibiot. Chemotherapy*, **3**: 915.

Szybalski W., 1953b: Genetics studies of microbial cross resistance to toxic agents. II. Cross resistance of *Micrococcus pyogenes var. aureus* to thirty four antimicrobial drugs. *Antibiot. Chemotherapy*, **3**: 1095.

Tornley M. J., Yudkin J., 1959a: Origine of bacterial resistance to proflavine. II. Spontaneous mutation to proflavine in *E. coli. J. gen. Microbiol.*, **20**: 365.

Tornley M. J., Yudkin J., 1959b: The origin of bacterial resistance to proflavine. Trening and reversion in *E. coli. J. gen. Microbiol.*, **20**: 355.

Vandermeulen J., 1957: Studies on the mode of resistance of *Bacterium coli* to streptomycin. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **41**: 411.

Voureka A., 1952: Induced variation in penicillin-resistant staphylococci. *J. gen. Microbiol.*, **6**: 352.

Welsch M., 1952: Some aspect of microbial resistance to streptomycine. *Bull. WHO*, **6**: 173.

Wise R. I., Spink W. W., 1954: The influence of antibiotics on the origin of small colonies (G variants) *Micrococcus pyogenes. J. Clin. Invest.*, **33**: 1611.

Woodruff H. B., Foster J. W., 1945: Microbiological aspects of penicillin. VII. Bacterial penicillinase. *J. Bact.*, **49**: 7.

Wyss O., Stone S. W., Clark J. B., 1947: Production of mutation in *Staphylococcus aureus* by chemical treatment of the substrate. *J. Bact.*, **54**: 767.

Yudkin J., 1953: Origine of acquired drug resistance in bacteria. *Nature*, **171**: 541.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 133—142

T. M. Lachowicz

THE MECHANISM OF DEVELOPMENT *IN VITRO* OF PENICILLIN-RESISTANT VARIANTS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

I. THE EFFECT OF DRUG CONCENTRATION ON THE NUMBER OF RESISTANT FORMS*

from the Department of Microbiology (Botanical Institute of Wrocław University) and Department of Microbial Genetics of L. Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy of Polish Academy of Science in Wrocław

Received: 3 April 1959

Origin of drug resistant forms of microorganisms is still a matter of dispute (Demerec 1957, Dean and Hinshelwood 1957). In the case of penicillin-resistance the problem is of great importance both from clinical and theoretical points of view. Demerec's (1945, 1948) multistep pattern of penicillin-resistance development has been accepted rather generally. Nevertheless there are many questions concerning Demerec's hypothesis to which there is still no satisfactory answer:

1° What is the basis of a strict correlation between antibiotic concentration and the number of resistant forms in a given bacterial population (Eagle, Fleischman and Levy 1952).

2° What are the limits of phenotypic variation in the sensitive genotype.

3° What is the basis of continuous resistance spectrum in population of I-step mutants. In further consequence it is difficult to ascertain the number of mutation steps in development of full resistance.

---

* Part of thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the Doctor degree at Wrocław University. These researches were partially supported by the grant of Microbiological Committee of the Polish Academy of Science.

These objections to the hypothesis of spontaneous mutation as only basis of development of penicillin-resistance have never been answered. Some additional conceptions must be set upon.

The present report deals with several of them, namely that additional mutants or mutants with phenotypically delayed expression may appear during the rest cell divisions before its stopping by penicillin. That such cell divisions take place has been shown in the early works of Rantz and Kirby (1944), of Lee, Foley and Epstein (1944, after Elek 1959) and of Hobby and Dawson (1944). Another possibility to be discussed here is Cavalli's suggestion (after Bryson and Szybalski 1955) that phenotypic variations between I-step mutants change vertical part of survival curve to more inclined one, or that there are many different I-step mutants.

MATERIAL AND METHODS

All investigations had been done on N° *209* strain of *Staphylococcus aureus*, that never previously had been in contact with penicillin. This strain has been subcultured four times from a single colony.

The medium used was 2 per cent nutrient agar (beef heart infusion, 1 per cent peptone and 0,5 per cent of NaCl).

Penicillin appropriately diluted in phosphate buffer (*pH* 6) was added to the nutrient agar cooled to 45-50°C. All procedure from preparing dillutions to pouring the plates did not last more than half an hour. Plates after setting of agar were dried for 1,5 hour at 37°C.

Bacteria were rinsed from 24 hours growth on slants, washed twice in saline and suspension was diluted so that it contained about 3×10^7 organisms per ml. This standard suspension was then appropriately diluted.

Sensitivity of bacteria was tested with dilution method. Dilutions of bacterial standard suspension were chosen to give in average 10 to 200 colonies per plate. These were counted after 24, 48 and 72 hours of incubation.

Number of rest cell divisions was investigated on two penicillin concentrations 0.025 units/ml and 0,05 units ml. 0,05 ml samples of tenfold diluted standard suspension were spread on the surface of approriate number of penicillin agar plates. Six disks 1 cm in diameter (three from each of two penicillin concentrations used) were cut out and put into chambers saturated with formalin vapours. Other plates were then put into incubator (37°C). After 2, 4, 8, 12 and 24 hours of incubation further pairs of plates were taken out, the disks cut out and put into formalin vapours in order to kill the bacteria and perserve them till the time of counting. By this procedure the original arrangement of bacterial cells in their clusters after various time of incubation and on chosen penicillin concentrations was preserved. The number of bacteria in 200 clusters on each disks were counted. So changes in number of bacterial cells in 600 clusters have been taken as a measure of rest cell divisions. Difference between the numbers of rest cell divisions on both penicillin concentrations was compared with difference between numbers of mutant colonies on the respective penicillin concentrations.

The resistance of mutants colonies was checked by plating of their suspensions in saline on nutrient and penicillin agar. Fractions of bacterial cells able to produce colonies on antibiotic concentrations on which given mutant has been isolated and on some higher were investigated.

RESULTS

Agar disks observed immediately after seeding showed bacterial cells lying singly (I) or in pairs (II). More numerous groups (III, IV, V and larger ones) were rare.

After two hours incubation pairs were most frequently encountered. First cell division must have taken place then. Nevertheless single cells were still observed especially on the higher penicillin concentration. In the meantime process of cell swelling began. It has been observed before by Gardner (1940), Shanahan, Eisenstarc and Tanner (1947), Pratt and Duffrenoy (1947). Process of swelling was more prominent on the lower penicillin concentration; it ceased after eight hours. Clusters of such swelled cells are shown in fig. 1.

Results recorded in table I show that marked differences in number of rest divisions on investigated penicillin concentrations could be noticed already after two hours of incubation. In the course of further incubation these differences increased. Incubation longer than 8 hours changed the number of cells in groups only slightly. The increase was observed only in these rare bacterial clusters that at this time already contained about 50 cells. Yet even after 24 hours single cells were observed beside clusters containing more than 10 cells. This seems to confirm Hughes observations (1957) on the variability of single cells resistance.

At this time process of dying of bacterial cells was also noticed. It was more marked on higher penicillin concentration. Dead cells were seen as shadows. After 24 hours incubation more than half of cells were already autolysed. In this connection in table I are shown results only up to 12 hours of incubation.

It is worth of reconsideration whether differences in rest cells divisions could explain the differences in number of resistant forms on investigated penicillin concentrations. If we assume that mutation rate is correlated with growth rate we may also expect some kind of correlation between numbers of appearing mutants and that of rest cell divisions. From the surivival curve (fig. 1) we can see that on penicillin concentration 0,025 units/ml there appear about fifty time more of resistant colonies than on 0,05 units/ml. Rest cell divisions on two tested concentrations of penicillin are ilustrated in table II. It seems unprobable that so small increase in number of rest cells divisions

might be looked upon as the only cause of fiftyfold increase in the number of mutants, on the assumption that the drug acts only as a selecting factor and mutants arise spontaneously. The number of resistant colonies appearing on both penicillin concentrations increased up to 72 hours of incubation but after 24 hours the difference in mutant number were even more prominent. From the other side increase in the

Table I

The size of bacterial clusters as influenced by penicillin concentration and time of incubation
Wielkość zgrupowań komórek w zależności od stężenia penicyliny i czasu inkubacji

Time of incubation, hours Czas inkubacji, godziny	Number of cells in clusters Ilość komórek w zgrupowaniu	Number of clusters Ilość zgrupowań	
		Penicillin concentration Stężenie penicyliny	
		0,025 units/ml	0,05 units/ml
0	I	399	409
	II	169	163
	III, IV, V	29	26
	VI—XI	2	0
	>XI	0	2
2	I	49	105
	II	225	265
	III, IV, V	257	170
	VI—XI	62	50
	>XI	7	9
4	I	5	15
	II	16	112
	III, IV, V	185	266
	VI—XI	248	133
	>XI	146	74
8	I	6	24
	II	24	89
	III, IV, V	130	275
	VI—XI	252	144
	>XI	188	68
12	I	1	18
	II	27	76
	III, IV, V	143	277
	VI—XI	209	145
	>XI	222	84

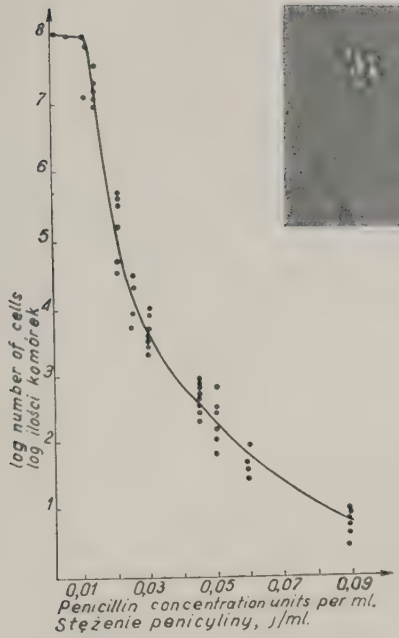
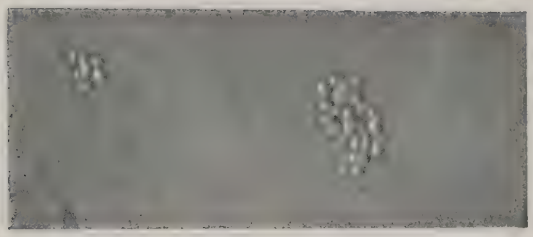


Fig. 1



Phot. 1

Phot. 1. Clusters of swelled *S. aureus* cells on penicillin—agar Unstained, 8×100

Fot. 1. Grupy napęczniałych gronkowców na agarze z penicyliną. Powiększenie 8×100

Fig. 1. Survival curve for *Staphylococcus aureus* on different penicillin concentrations

Rys. 1. Krzywa przeżywalności gronkowca złocistego w obecności różnych stężeń penicyliny

Fig. 2. Resistance of organisms in six mutant colonies grown on agar medium containing 0,03 units of penicillin per ml

Rys. 2. Oporność komórek w sześciu koloniach mutantów, izolowanych na podłożu z 0,03 j/ml penicyliny

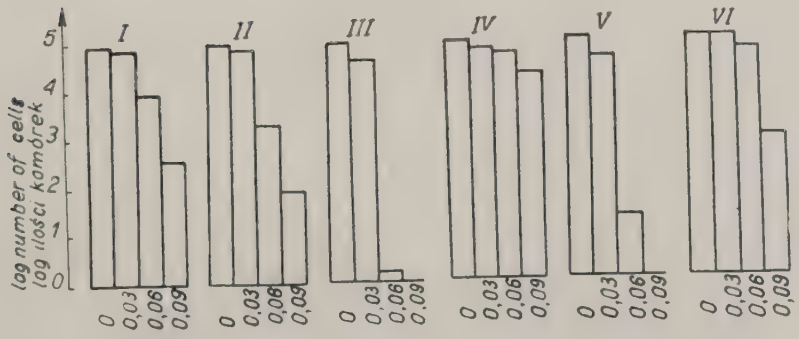


Fig. 2

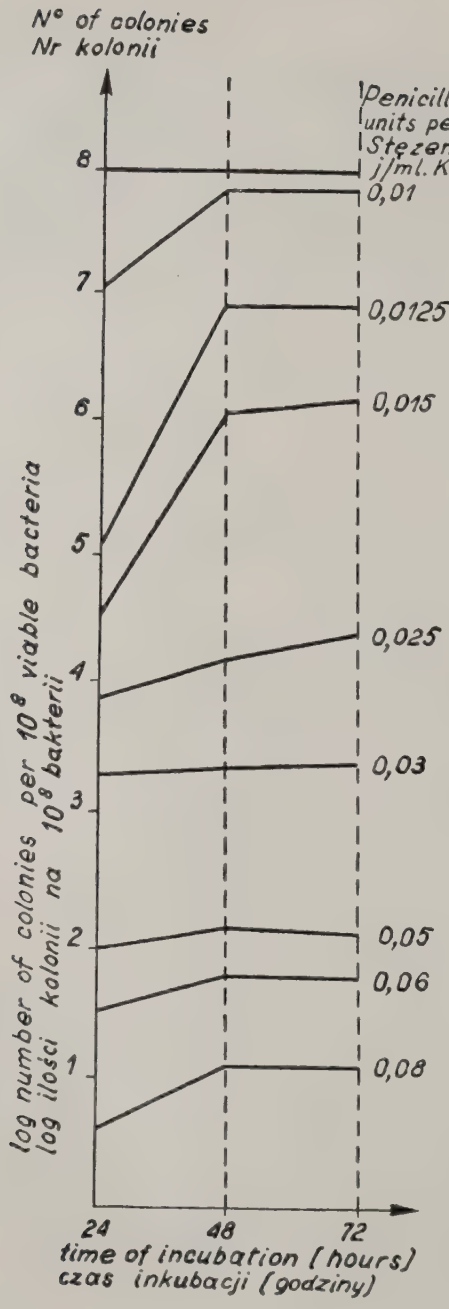


Fig. 3

Fig. 3. Relationship between the time of apperance of colonies and the concentration of penicillin in medium

Rys. 3. Stosunek między czasem pojawiania się kolonii a stężeniem penicyliny w podłożu

cell number as the result of rest divisions came to an end already after 8 hours of incubation.

We should next consider the second alternative, namely that the phenomenon we are speaking about is produced by physiological differences among the cells of first step mutants. In order to test this the resistance of organisms in colonies picked up from plates with penicillin concentration of 0,03 units/ml was examined. The results of one typical experiment are shown in fig. 2. There are distinct differences in the degree of resistance both between different colonies and between bacterial cells forming given colony. They were observed even on penicillin concentration from which colonies were isolated. The percentage of cells able to form here resistant colonies varied from 50 to 80 per cent of total number of cells per colony. These differences were more prominent on higher penicillin concentrations. Bacteria from some colonies formed on 0,09 units/ml of penicillin minute colonies which appeared after 72 hours of incubation. These were probably *G* forms. The minute colonies were received mostly from the late appearing forms.

Table II

Effect of penicillin of the number of rest cell divisions
Wpływ penicyliny na ilość podziałów resztkowych po 8 godzinach inkubacji

	Penicillin concentration / Stężenie penicyliny	Time of incubation (hours) / Czas inkubacji (godz.)	Number of bacterial cells in 600 clusters / Ilość komórek w 600 zgrupowaniach					Average number of rest cell divisions / Średnia ilość podziałów resztkowych
	Experiment № / Numer eksperymentu		1	2	3	4	5	
A	0,025 units/ml	0	830	873	973	913	867	2,56
B		8	6 329	4 460	4 667	5 697	5 352	
C	0,05 units/ml	0	949	961	883	897	931	1,58
D		8	3 413	2 451	2 638	2 691	2 712	
B D	after 8 hours / po 8 godzinach		decrease in the rest cell divisions on 0,05 units in relation to that on 0,025 units . . . . . 1,62 fold zmniejszenie ilości podziałów resztkowych na 0,05 j/ml w stosunku do ilości podziałów na 0,025 j/ml . . . . 1,62 - krotnie					

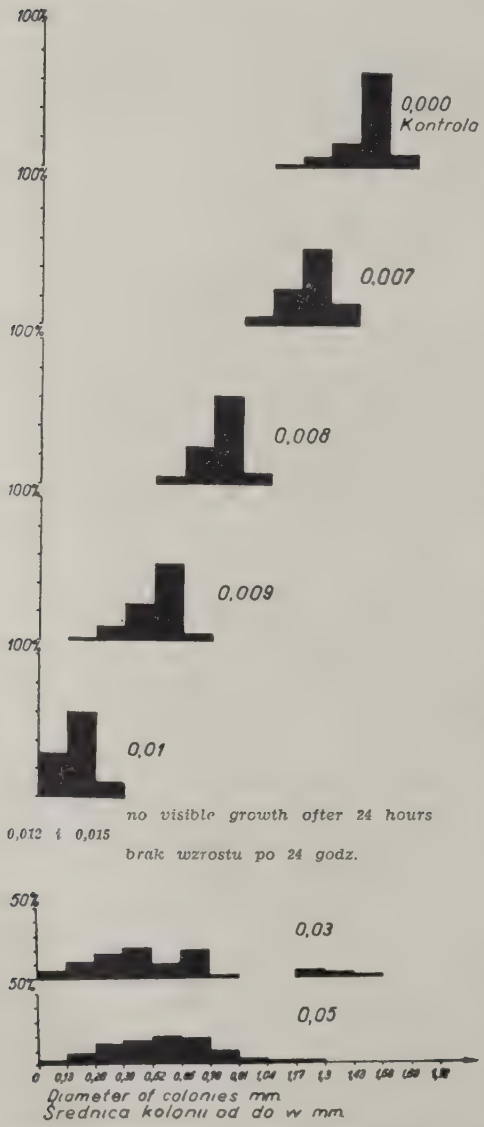


Fig. 4. Distribution of sizes of colonies on various penicillin concentrations; incubation 24 hours

Rys. 4. Rozrzut rozmiarów kolonii na różnych stężeniach penicyliny

We did not find any correlation of the degree of resistance with the time of emerging of the resistant forms.

These results have shown great differences in the degree of resistance between first step mutants. These may account for the decrease in resistant colony number with the increase in the drug concentrations. These differences may be of physiological nature or genetic one, or both. If such differences exist between I step mutants before plating, then on higher penicillin concentrations colonies should be formed only by the mutants with higher resistance. That such is the case follows from table III, where fractions of the resistant cells to the several drug concentrations in 24 mutant colonies picked up from agar plates with 0,025 and 0,05 units of penicillin per ml are recorded. Some resistant forms encountered on the lower penicillin concentration were not isolated from agar plates with the higher concentration.

The results depicted in table III and fig. 2 are suggestive of the existence of many types of I step mutants.

Table III

Fraction of the resistant forms in the colonies picked up from the penicillin-agar plates with antibiotic concentration 0,025 units/ml and 0,05 units/ml
Frakcja opornych komórek w koloniach rosnących na agarze z 0,025 j/ml i 0,05 j/ml penicyliny

Nr of colony / Nr kolonii	Penicillin concentration the colonies come from / Stężenie penicyliny, z jakiego pochodzą kolonie									
	0.025					00.5				
	Penicillin concentration in medium the bacteria are plated on: / Stężenie penicyliny w podłożu, na które wysiano bakterie:									
	0.00	0.025	0.05	0.075	0.1	0.00	0.025	0.05	0.075	0.1
1	10^5	76×10^3	41×10^3	15×10^2	78	10^5	95×10^3	41×10^3	96×10^1	68
2	10^5	71×10^3	0.7	0	0	10^5	92×10^3	25×10^3	57×10^2	32×10^1
3	10^5	46×10^3	2.3	0	0	11^5	99×10^3	40×10^3	156×10^1	57
4	10^5	83×10^3	40×10^3	17×10^2	86	10^5	86×10^3	25×10^3	115×10^2	35×10^1
5	10^5	87×10^3	40×10^3	10×10^2	78	10^5	91×10^3	43×10^3	125×10^1	61
6	10^5	50×10^3	2.5	0	0	10^5	94×10^3	49×10^3	234×10^2	29×10^1
7	10^5	62×10^3	0.6	0	0	10^5	77×10^3	33×10^3	104×10^1	63
8	10^5	56×10^3	0.8	0	0	10^5	64×10^3	50×10^3	177×10^1	51
9	10^5	88×10^3	39×10^3	13×10^2	87	10^5	75×10^3	50×10^3	140×10^2	34×10^1
10	10^5	63×10^3	1.4	0	0	10^5	83×10^3	36×19^3	159×10^2	48×10^1
11	10^5	71×10^3	47×10^3	112×10^2	33×10^1	10^5	96×10^3	45×10^3	166×10^1	60
12	10^5	96×10^3	3.1	0	0	10^5	91×10^3	37×10^3	157×10^1	59

The observation of mutants giving minute colonies seems to support this conception.

There arise then the problem of number of different types of the first step mutants. This will be discussed in the next part of present paper (Lachowicz 1960a).

The demonstration of several different I step mutants does not exclude the role of physiological difference between cells belonging to given mutant type. To test this possibility the diameters of the colonies after 24 hours incubation, on different penicillin concentrations were measured. At the same time the number of colonies, appearing in the presence of the respective drug concentrations after 24, 48 and 72 hours of incubation, was recorded. The results of some typical experiments are shown in figures 3 and 4. Two distinct types of behaviour were there noted. One is represented by original susceptible population. The second one by population of the I step mutant. Practically all susceptible cells spread on the plate containing up to 0,008 units of antibiotic per ml formed colonies already after 24 hours of incubation. With increasing penicillin concentration (up to 0,015 units/ml) the time needed for full development of colonies increased. At the same time the

fraction of cells forming colonies diminished to 1 per cent. This may be interpreted only as the result of physiological differences between susceptible cells of original strain. Quite different picture was observed on penicillin concentration 0,02 μ/ml and higher. Here no such increase in number of colonies after prolonged incubation was to be seen. All cells able to form colonies developed already after 24 hours. They belonged to I step mutants as was shown before. When concentration of penicillin was further increased (to 0.04 μ/ml) the same phenomenon, as in original susceptible population, was observed (see curve 0,05 μ ml in fig. 3). Thus it is clear that population of I step mutants is not phenotypically uniform. On the contrary it shows the heterogeneity more distinct then that of original strain, but on higher level of resistance.

DISCUSSION

From the first Demerec's work (1945) on the genic origin of staphylococcal variants resistant to penicillin this problem has been under extensive investigations by the use of different methods. Conclusions are not quite uniform. Fluctuation test of Luria and Delbruck (1943) applied to the investigations of drug resistance by Demerec (1948) has been criticised from the theorethical (Hinshelwood 1952, Dean, Hinshelwood 1953) and experimental point of view (Eriksen 1949, 1953, Banic 1954). As to the replica test suggested by Lederbergs (1952), Banic in his investigations (1958) was not able to obtain by this method fully resistant clones. Barber (1953) had come to the conclusion that in the case of development of resistance to penicillin the process of adaptation may play some role.

On the other hand in the experiments on transformation of penicillin-resistance in pneumococci (Hotchkiss 1951) the connection of this feature with genic material has been shown to exist.

It has been found by Mayr-Harting (1953) that the first step mutants differ quite remarkably in their resistance. Number of the mutants in original sensitive population decreases gradually with the increasing of the drug concentration. Their colonies emerge at different times.

Some attempts to elucidate these phenomena have been undertaken in the course of the present investigations. It has been clearly shown that there are several types of I step mutants, differing in the degree of resistance. The population of I step mutants is also physiologically very heterogeneous especially in the respect of the resistance to the antibiotic.

These both phenomena may at least partially account for inclined shape of survival curve. The role of rest cell divisions in this respect is doubtful.

Explanation suggested by Hinshelwood (1946) in the form of automatic adaptation should be applied seperatelly to the physiological variation inside the sensitive population and separatelly to the mutants.

Linz's (1950) hypothesis of induced mutation, suggested also by Barber (1957) and Westergard (1957) should not be ignored (see part III of authors paper — Lachowicz 1960b).

ACKNOWLEDGEMENT

The author is indebted to the Chief of the Departments, Prof. Dr. Wł. Kunicki-Goldfinger for the encuragement, advice and help received during research-work and preparing of the manuscript.

LITERATURE

Banic S., 1954: Über die Rolle der Adaptation bei der Entstehung der bakteriellen Resistenz gegen Chemotherapeutica. *Schweiz. Ztschr. allg. Pathol. Bact.*, **17**: 183.

Banic S., 1958: Isolation by replica plating technique of the mutant of *Staphylococcus aureus* partially resistant to low concentration of penicillin. *Schweiz. Ztschr. allg. Pathol. Bact.*, **21**: 54.

Barber M., 1953: Antibiotic-resistant staphylococcal variants. *Symposium Soc. Gen. Microbiol. Cambridge Univ. Press.*, **3**: 235.

Barber M., 1957: Drug resistance of *Staphylococcus aureus* with special reference to penicillinase production. Drug resistance in microorganisms. *Ciba Symposium*, London, Churchill Ltd.: 262.

Dean A. C. R., Hinshelwood C. N., 1953: Observation on bacterial adaptation. *Symposium Soc. Gen. Microbiol.*, **3**: 18.

Dean A. C. R., Hinshelwood C. N., 1957: Aspects of the problem of drug resistance in bacteria. Drug resistance in microorganisms. *Ciba Symposium*. London, Churchill Ltd.: 5.

Demerec M., 1945: Production of staphylococcal strains resistant to various concentration of penicillin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **31**: 16.

Demerec M., 1948: Origin of bacterial resistance to antibiotics. *J. Bact.*, **56**: 63.

Demerec M., 1957: Genetic aspects of drug resistance. Drug resistance in microorganisms. *Ciba Symposium*, London, Churchill Ltd.: 47.

Eagle H., Fleischman R., Levy M., 1952: Development of increased bacterial resistance to penicillin, chloramphenicol and streptomycin *J. Bact.*, **63**: 623.

Elek S. D., 1959: *Staphylococcus pyogenes*. Livingstone Ltd., Edinburgh and London.

Eriksen K. R., 1949: Studies on the mode of origin of penicillin-resistant staphylococci. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **26**: 269.

Eriksen K. R., 1953: On the validity of the fluctuation test in the studies on the mode of origin of penicillin-resistant staphylococci. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **32**: 393.

Gardner A. D., 1940: Morphological effect of penicillin on bacteria. *Nature*, **146**: 837.

Hinshelwood C. N., 1946: The chemical kinetics of the bacterial cell. Oxford, Clarendon Press.

Hinshelwood C. N., 1952: On the chemical kinetics of autosynthetic systems. *J. Chem. Soc.*; 745.

Hobby G. L., Dawson M. H., 1944: Bacteriostatic action of penicillin on hemolytic streptococci *in vitro*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **56**: 178.

Hotchkiss R. D., 1951: Transfer of penicillin-resistance by the desoxyribonucleate derived from resistant cultures. *Cold. Spring Harb. Symposium. Quant. Biol.*, **16**: 457.

Hughes W. H., 1957: Inheritance in single bacterial cells. Drug resistance in microorganisms. *Ciba Symposium*, Churchill Ltd.: 64.

Lachowicz T. M., 1960a: The mechanism of development *in vitro* of penicillin-resistant variants of *S. aureus*. II *Acta Microbiol. Polon.*, **9**: 143.

Lachowicz T. M., 1960b: The mechanism of development *in vitro* of penicillin-resistant variants of. *S. aureus*. III (in press).

Lederberg J., Lederberg E. M., 1952: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bact.*, **63**: 399.

Linz R., 1950: Sur le mechanisme de l'action de la *Streptomycine*. II. La resistance a la *Streptomycine*. *Ann. Inst. Pasteur*, **78**: 233.

Luria S. E., Delbrück M., 1943: Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, **28**: 491.

Mayr-Harting A., 1953: The acquisition of penicillin-resistance by *Staphylococcus aureus* strain *Oxford*. *J. gen. Microbiol.*, **13**: 9.

Pratt R., Dufrenoy J., 1947: Cytochemical mechanisms of penicillin action. II. *J. Bact.*, **54**: 127.

Rantz L. A., Kirby M. M., 1944: The action of penicillin on the *Staphylococcus in vitro*. *J. Immunol.*, **48**: 335.

Shanahan A. J., Eisenstarc A., Tanner F. W., 1947: Morphology of *E. coli* exposed to penicillin as observed with the electron microscope. *J. Bact.*, **54**: 183.

Westergaard M., 1957: On the identification of genetic and nongenetic variation in bacteria. Drug resistance in microorganisms. *Ciba Symposium*. London, Churchill Ltd.: 280.

T. M. Lachowicz

MECHANIZM POWSTAWANIA PENICYLINOOPORNOŚCI U GRONKOWCA ZŁOCISTEGO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN VITRO*

I. WPŁYW STĘŻENIA ANTYBIOTYKU NA ILOŚĆ OPORNYCH FORM

Streszczenie

Badano przyczyny powodujące ciągłość w zmniejszaniu się ilości opornych form, wyrastających na podłożach z wzrastającymi stężeniami penicyliny. Stwierdzono, że różnice w ilości resztkowych podziałów i związane z tym dodatkowe spontaniczne mutacje, nie stanowią jedynej przyczyny tego zjawiska. Stwierdzono wśród komórek I-stopniowego mutanta znaczne różnice fizjologiczne w oporności, jak również występowanie kilku typów I-stopniowych mutantów różniących się opornością. Te dwa dalsze czynniki mogą nadawać poziomej części krzywej przeżywalności kształt pochyły.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 143—150

T. M. Lachowicz

THE MECHANISM OF DEVELOPMENT *IN VITRO* OF PENICILLIN-RESISTANT VARIANTS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

II. FURTHER INVESTIGATION ON THE FLUCTUATION TEST IN THE STUDY OF ORIGIN OF PENICILLIN-RESISTANCE *

from the Department of Microbiology (Botanical Institute of Wrocław University) and Department of Microbial Genetics of L. Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy of Polish Academy of Science in Wrocław

Received: 3 April 1959

Fluctuation test of Luria and Delbrück (1943) in adaptation to the problem of drug-resistance (Demerec 1948, Oakberg and Luria 1947, Newcombe and Hawirko 1949) met with several objections both from theoretical and experimental points of view (Dean and Hinshelwood 1952a, 1952b, Eriksen 1949, Banic 1954). Particularly striking is the disagreement between Demerec (1948), Eriksen (1949) and Banic (1954) who worked with the same microorganism and drug. Hence the problem seemed to be interesting and worth of examination.

METHODS AND RESULTS

Fluctuation test has been performed according to the single colonies method used by Eriksen (1949). Twenty five single colonies from nutrient agar after 24 hours incubation were used instead of twenty five independent broth cultures. Appropriately diluted culture of *Staphylococcus aureus* strain *209* in logarythmic phase of growth, fully sensitive to penicillin was spread on the surface of the agar. Separately lying colonies were equal in size. This seemed to be a sufficient premise for supposing that they had been in the same physiological state. The influence of possible glass impurity was of the same degree in each colony, as they were taken up from one plate.

The diameters of the colonies to be used in the test were checked by the

---

* Part of thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the Doctor degree at Wrocław University. These researches were partially supported by the grant of Microbiological Committee of the Polish Academy of Science.

Table I

Distribution in the number of resistant colonies
Rozrzut ilości opornych kolonii

Sample Nº Nr próby	In the samples from the same suspension W próbach z tej samej zawiesiny			In the samples from suspensions of single colonies W próbach z zawiesin pojedynczych kolonii		
	penicillin concentration, units/ml — stężenie penicyliny, j/ml					
	0,07	0,05	0,045	0,07	0,05	0,045
1	21	43	185	4	10	387
2	14	34	174	6	48	132
3	15	64	248	10	7	102
4	6	36	172	29	40	149
5	15	49	159	8	5	249
6	15	48	237	6	12	95
7	18	35	177	4	9	2000
8	11	37	183	4	32	108
9	16	54	179	11	19	107
10	14	52	174	3	24	78
11	14	42	140	12	26	221
12	18	49	168	8	20	97
13	17	55	161	4	300	99
14	23	42	167	1	8	150
15	19	40	167	4	54	100
16	27	43	185	14	25	105
17	15	35	183	7	38	56
18	20	34	177	4	11	98
19	22	39	194	59	17	139
20	16	30	198	8	83	159
21	17	53	—	12	28	399
22	13	56	—	9	8	101
23	13	54	193	12	38	60
24	17	34	164	19	14	48
25	10	56	161	3	111	40
Mean	16	45	180	10	39	207
Variance	19,7	83	1372	132	3340	772500
Chi—squere	28	46	70	335	2138	17102
P	0,3	0,001	0,001	much less than 0.001		

use of microscope. Colonies having the same diameter were cut up and suspended separately in 0,3 ml of sterile saline. At the same tmie mixed suspension of 10 colonies has been made in 3 ml saline. Samples of 0,1 ml from each of 25 suspensions were spread on the surface of 25 plates with nutrient agar and penicillin in the same concentration (0,045 μ/ml). On another set of 25 plates 25 samples (0,1 ml) taken from mixed suspension of 10 colonies were spread. The plates were incubated at 37°C for 72 hours and number of resistant colonies counted after 24, 48 and 72 hours. The number of bacteria in 5 single colonies in every

test was checked by dilution method. The number of bacterial cells per colony was $2\times10^8\pm0,4\times10^8$ in average.

Eight such tests were conducted. Table I shows the results of three of them. The fluctuation in number of resistant forms among suspensions of separates colonies was much higher than that obtained in mixed suspension. Nevertheless, in a few cases, the latter was quite big and frequently the variance exceeded the limits of random variability.

These results seemingly confirm B a n i c's (1954) suggestion that the fluctuation test is of limited use in investigations of the origin of penicillin-resistance.

T a b l e II

Distribution in the number of the resistant forms in three equal samples from single colonies suspensions
Rozrzut ilości opornych form w trzech jednakowych próbkach z zawiesin pojedynczych kolonii

Nº of colony Nr kolonii	Number of resistant forms in sample Ilość opornych form w próbce			
	I	II	III	mean
1	58	52	64	58
2	51	50	43	48
3	36	43	21	33
4	87	68	87	81
5	24	14	22	20
6	27	16	13	19
7	11	14	14	13
8	67	51	52	57
9	68	44	66	59
10	90	116	112	107
11	64	60	53	59
12	49	50	47	49
13	26	26	14	22
14	51	51	54	52
15	72	61	120	84
16	59	93	61	71
17	39	17	19	25
18	58	43	33	44
19	26	43	12	27
20	64	71	37	57
21	20	17	11	16
22	15	13	16	15
23	14	13	16	14
24	30	34	18	27
25	8	15	10	11
Average	45	43	40	41
Variance	773	914	987	762

In this connection yet it is worthy of consideration that in each test some colonies gave exceedingly high number of resistant organisms. These resistant cells formed colonies of the same size, pigmentation and approximately characterized by the similar development time.

In order to exclude the role of chance in this phenomenon, in two cases the fluctuation test was made in triplicate. Table II shows the results of one of them. It seems rather obvious that suspensions giving greater than average number of resistant forms in one set of plates showed the same in two others. The same is true in the case of colonies giving much lower than average number of resistant forms.

The results of observations on the distribution of the resistant forms of the same morphological characteristic shown in Table III, confirm this conclusion.

Table III

Frequency of colonies of various morphological structure in experiment shown in table II. Number of resistant colonies

Częstość występowania kolonii o różnej strukturze morfologicznej w doświadczeniu ilustrowanym w tabeli II. Ilość opornych kolonii

Nº of colony	Type I			Type II			Type III			Type IV			Small colonies		
1	4	3	3	2	3	1	25	22	31	4	3	6	23	21	23
2	0	0	1	2	3	3	19	24	20	6	4	1	24	19	18
3	0	0	0	1	0	0	22	31	10	1	4	0	12	8	11
4	2	1	1	2	1	1	22	22	24	12	8	5	49	36	56
5	2	2	2	2	0	1	13	10	12	2	2	3	5	0	4
6	2	2	2	2	1	2	9	5	4	5	4	2	9	4	3
7	2	1	1	1	0	1	3	4	3	3	3	3	2	6	6
8	2	6	2	7	2	2	31	22	23	8	6	5	19	15	20
9	4	3	3	6	6	5	28	22	21	5	2	5	25	11	32
10	2	2	1	0	0	0	18	24	26	7	3	5	66	87	80
11	5	2	1	7	3	0	28	30	23	9	8	15	15	17	14
12	0	4	2	2	1	1	20	23	29	5	1	3	22	21	12
13	0	0	0	3	3	1	12	20	6	2	0	0	9	3	7
14	2	2	1	1	3	7	21	17	22	5	8	4	22	21	20
15	40	43	58	2	0	8	26	18	47	4	0	1	0	0	6
16	3	1	0	34	39	35	14	25	20	3	10	4	5	18	2
17	5	5	0	8	3	6	6	5	6	3	1	1	17	3	6
18	3	2	1	6	1	1	14	12	8	12	8	7	23	20	16
19	1	0	0	2	1	1	8	25	4	2	2	0	13	15	7
20	0	1	0	0	4	0	30	32	23	2	4	3	32	30	10
21	0	0	0	1	3	0	9	4	4	3	2	3	7	8	4
22	3	1	2	0	0	1	6	5	6	1	1	1	5	7	6
23	1	3	1	2	0	0	5	3	6	1	4	3	5	3	6
24	2	0	2	1	2	1	6	10	5	8	8	2	13	14	8
25	0	0	0	0	1	0	5	7	6	1	0	0	2	7	4

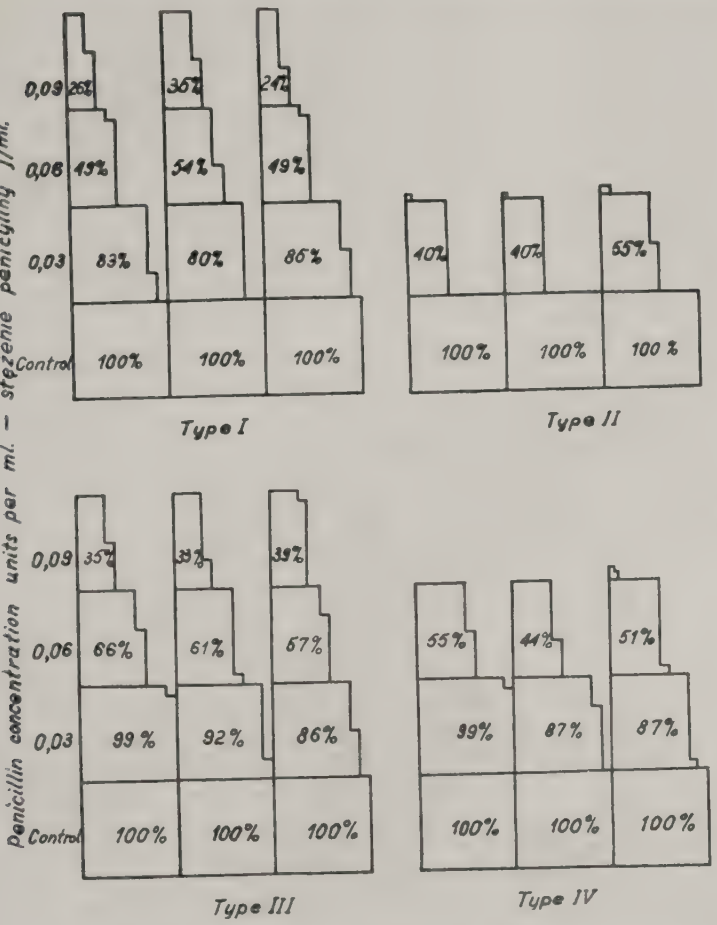


Fig. 1. Resistance to penicillin of organisms from four morphological types of colonies appearing in fluctuation test (see table III)
Rys. 1. Oporność na penicylinę komórek z czterech typów morfologicznych kolonii, pojawiających się w próbie fluktuacyjnej (patrz tab. III)

In the case of the resistant colonies of the same morphological appearance fluctuation in their count was much greater than in the total number of resistant forms.

Thus, very weakly resistant colonies appearing after 48 hour incubation were received in greatest number from the suspension of colony

N° 10. From the suspension of the colony N° 15 most numerous were weakly pigmented, translucent colonies. These showed a tendency to give the secondary growth. From the suspension of colony N° 16 we received growth in the form of small, strongly pigmented colonies.

Colonies showing light streaps going radiantly out of the centre were observed too. These were encountered on all the plates.

The fact that the suspension of a given colony when spread on the agar plate gave growth of resistant forms generally of one morphological type suggested their clonal relationship (Cavalli-Sforza and Lederberg, test of correlation between relatives, 1953).

In this case the degree of resistance of colony should be correlated to the morphology.

In order to check this possibility four morphological types of colonies were distinguished. From each type (type I, II, III and IV from the plate N° 15, 16, 20 and 11 respectively, see Table III) three colonies were emulsified and resistance of them was tested. Results in fig. 1 show a clear cut difference in the degree of resistance between colonies of three different types and a quite marked similarity in this respect between colonies of the same morphology.

So, clonal origin of resistant forms founds a further support.

DISCUSSION

The problem of the development of the penicillin-resistance from the genetical point of view is a difficulte one. This results first of all from the complicated multistep pattern of the resistance development, from the effect of drug concentration on the number of resistant forms and from the fact that in a single mutational step several types of mutants are encountered (Barber 1953, Mayr-Harting 1953).

The last fact makes the interpretation of the results obtained in fluctuation test rather difficult. In the case of drug-resistance the tests dit not show such prominent fluctuation in the number of resistant forms as in the experiments with phages. It was presumably because fluctuation in number of mutant of one type was masked by fluctuations in number of other types of mutants. Hence arrise also difficulties with computing of mutation rate from the results of fluctuation tests.

From the other side marked fluctuation in number of resistant colonies in the samples from the single culture observed in Banic's (1953) and our experiments indicated that validity of this test should be confirmed by some other test. for example, as in our case, by correlation between relatives test. Necessity of such procedure seems to be

important also because of Hinshelwood's and Eriksen's both theoretical and experimental objections.

In our experiments fluctuation in the number of resistant forms, in the samples from single colonies more prominent than in the case of samples taken from one suspension, confirms Demerec's thesis on the mutational origine of resistant forms. Forms obtained from single colonies frequently showed the same morphological appearance correlated with the degree of resistance. This fact may find reasonable explanation only in supposition that they must arise in investigated colonies and form clones prior to drug action. Clonal origin of resistant forms supplies further proof for the mutational origin of resistant forms.

ACKNOWLEDGEMENT

The author is indebted to the Chief of the Departments, Prof. Dr. Wł. Kunicki-Goldfinger, for the encouragement, advice and help recived during research work and preparing of the manuscript.

LITERATURE

Bánic S., 1954: Über die Rolle der Adaptation bei der Entstehung der bakteriellen Resistenz gegen Chemotherapeutica. *Schweiz. Ztsch. allg. Path. Bact.*, **17**: 183.

Barber M., 1953: Antibiotic-resistant staphylococcal variants. *Symp. Soc. gen. Microbiol.* Cambridge Univ. Press. **3**: 235.

Cavalli-Sforza L. L., Lederberg J., 1953: Genetics of resistance to bacterial inhibitors. *VI-th Int. Congr. Microbiol.*, Roma: 108.

Dean A. C. R., Hinshelwood C. N., 1952a: Colony formation by *B. lactis aerogenes* on solid media containing antibacterial agents. *Proc. Roy. Soc. B.* London, **140**: 339.

Dean A. C. R., Hinshelwood C. N., 1952b: The resistance of *B. lactis aerogenes* to proflavine. *Proc. Roy. Soc. B*, London, **139**: 236.

Demerec M., 1948: Origin of bacterial resistance to antibiotics. *J. Bact.*, **56**: 63.

Eriksen K. R., 1949: Studies on the mode of origine of penicillin resistant staphylococci. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **26**: 279.

Mayr-Harting A., 1953: The acquisition of penicillin resistance by *Staphylococcus aureus* strain Oxford. *J. gen. Microbiol.*, **13**: 9.

Luria S. E., Delbrück M., 1943: Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, **28**: 491.

Newcombe H. B., Hawirko R., 1949: Spontaneous mutation to streptomycin resistance and dependance in *E. coli*. *J. Bact.*, **57**: 572.

Oakberg E. F., Luria S. E., 1947: Mutation to sulfonamide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Genetics*, **32**: 249.

T. M. Lachowicz

Streszczenie

MECHANIZM POWSTAWANIA PENICYLINOOPORNOŚCI U GRONKOWCA ZŁOCISTEGO *STAPHLOCOCCUS AUREUS IN VITRO*

II. ZASTOSOWANIE TESTU FLUKTUACYJNEGO DO BADAŃ NAD MECHANIZMEM POWSTAWANIA FORM OPORNYCH NA PENICYLINĘ

W przeprowadzonym na oddzielnych koloniach teście fluktuacyjnym stwierdzono znacznie większą fluktuację w ilości form opornych na płytkach zasianych zawiesinami oddzielnych kolonii, niż na płytkach zasianych jedną zawiesiną. Zawiesiny kolonii, dające znacznie większą niż przeciętna ilość opornych form, dawały oporne kolonie w większości morfologicznie podobne. Z podobieństwem morfologicznym związane było również podobieństwo w stopniu oporności. Fakty te świadczą o klonalnym pochodzeniu, a tym samym przemawiają za preadaptacyjną genezą form opornych na penicylinę.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 151—155

I. Reifer i *M. Możejko-Toczko*

MIKROBIOLOGICZNA METODA ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA LUPANINY

Z Zakładu Biochemii Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki
Polskiej Akademii Nauk

Wpłynęło 20 sierpnia 1959 r.

WSTĘP

W dostępnej literaturze nie znaleziono wzmianki o zastosowaniu mikroorganizmów do ilościowego oznaczania alkaloidów, mimo że od lat stosowane są drobnoustroje do oznaczania wielu związków.

Już Bucherer (1942) zauważył, że przy mikrobiologicznym rozkładzie nikotyny tworzy się amoniak w ilości proporcjonalnej do ilości rozłożonej nikotyny.

Wyizolowany w naszym Zakładzie (Możejko-Toczko 1960) szczep *Pseudomonas lupanini*, korzystając z lupaniny jako jedynego źródła azotu i węgla, wytwarza poza amoniakiem produkty rozkładu, które dają zabarwienie z odczynnikiem Nesslera. Intensywność tego zabarwienia jest proporcjonalna do ilości podlegającej rozkładowi lupaniny. Właściwość ta została wykorzystana do opracowania mikrobiologicznej metody ilościowego oznaczania lupaniny.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

OPIS METODY, ODCZYNNIKI

a. Roztwór soli mineralnych
3% KH_2PO_4
3% K_2HPO_4
0,5% NaCl
0,5% $MgSO_4$
1 kropla 5-procentowego roztworu $FeCl_3$ na 1 litr pożywki
woda redestylowana
Jest to roztwór 10-krotnie skoncentrowany i służy do przygotowania pożywek .
b. Pożywka na skosy agarowe

Odważyć 1 g agaru, umieścić w kolbce stożkowej w 100 ml wody destylowanej, zaznaczyć poziom płynu kredką tłuszczową na ściance kolbki i pozostawić na 24 godzin. Następnie zlać wodę znad agaru, dodać 10 ml roztworu soli mineralnych (a) i 0,1 g lupaniny, uzupełnić wodą destylowaną do kreski i rozpuścić agar w aparacie Kocha. Pożywkę rozlać do probówek z korkiem z waty i sterylizować 3 razy po 15 minut w aparacie Kocha. Po trzeciej sterylizacji pozostawić probówki w pozycji skośnej aż do zestalenia się agaru.

c. Pożywka płynna (100 ml)

Do 10 ml roztworu soli mineralnych (a) dodać 0,1 g lupaniny i uzupełnić wodą redestylowaną do 100 ml. Rozlać pożywkę do probówek z korkiem z waty (około 10 ml na probówkę) i sterylizować 3 razy po 15 minut w aparacie Kocha.

d. Woda redestylowana wyjałowiona

50 ml wody redestylowanej w 100-mililitrowej kolbce stożkowej z korkiem z waty sterylizować przez 30 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery lub 3 razy po 15 minut w aparacie Kocha.

e. Zawiesina bakteryjna

Ze skosu agarowego (b) przeszczepić bakterie oczkiem chromonikielinowym lub platynowym na pożywkę płynną (c) i pozostawić do inkubacji na 1 dobę w temperaturze 27°. Następnie przenieść jałowo 1 ml tej pożywki do 50 ml wyjałowionej wody redestylowanej (d) w celu uzyskania zawiesiny bakteryjnej.

f. Odczynnik Nesslera

I. 37,5 g KJ rozpuścić w 25 ml wody destylowanej, a następnie w roztworze tym rozpuścić 50 g HgJ_2. Gdy jodek rtęci ulegnie zupełnemu rozpuszczeniu, całość rozcieńczyć wodą destylowaną do 250 ml, przesączyć przez sączek i ponownie rozcieńczyć do 500 ml.

II. 10-procentowy roztwór wodny NaOH.

300 ml roztworu I zmieszać z 1400 ml roztworu II i uzupełnić do dwóch litrów wodą destylowaną.

PRZYGOTOWANIE PRÓBY DO OZNACZANIA

Do 50-mililitrowych kolbek stożkowych napipetować badanego roztworu lupaniny, w którym zawartość lupaniny nie przekracza 200-2000 mikrogramów na próbę, 1 ml roztworu soli mineralnych (a) i uzupełnić wodą redestylowaną do objętości 9 ml. Kolbki z tak przygotowaną pożywką sterylizować 3 razy po 15 minut w aparacie Kocha. Po ostudzeniu szczepić kolbki 1 ml zawiesiny bakteryjnej (e). Końcowa objętość płynu powinna wynosić 10 ml. Inkubować próby przez 42 godziny w temperaturze 27°.

Gdy w roztworze obok lupaniny znajduje się hydroksylupanina, lupaninę trzeba oddzielić w następujący sposób: 5 ml roztworu zawierającego lupaninę i hydroksylupaninę zalkalizować w rozdzielaczu 1 ml nasyconego węglanu sodowego i ekstrahować chloroformem 3 razy po 5 ml. Chloroform zebrać w 50-mililitrowej kolbce stożkowej i dodać 3 krople wody destylowanej. Chloroform oddestylować na łaźni wodnej. Zawartość kolbki ekstrahować 4 razy po 5 ml eteru naftowego, przez zamknięcie gumowym korkiem i wytrząsanie. Do zebranych wyciągów eterowych dodać około 1 ml wody i oddestylować eter na łaźni wodnej. Uzyskany wyciąg lupaniny rozcieńczyć do wyjściowej objętości.

Wykonanie oznaczenia

Z inkubowanych próbek odpipetować po 5 ml płynu do suchych probówek, dodać 2 ml odczynnika Nesslera (f), wymieszać, przelać zawartość probówki do probówki kolorometrycznej i natychmiast oznaczać w fotokolorymetrze Leitza przy filtrze C.

Próbę kontrolną stanowi 5 ml 10-krotnie rozcieńczonego roztworu soli mineralnych (a) z dwoma mililitrami odczynnika Nesslera.

Wykreślenie krzywej standardowej

Odważyć 27 mg chlorowodorku lupaniny (lupanina . HCl . $2H_2O$) co odpowiada 20 mg czystej lupaniny, rozpuścić w małej ilości wody destylowanej i rozcieńczyć do 10 ml (2000 μg na ml). Z tego roztworu przygotować pożywki o stężeniach 2000, 1600, 1000, 800, 400 i 200 mikrogramów na 9 ml próby. Po sterylizacji szczepić jednym mililitrem zawiesiny bakteryjnej (e). Po inkubacji pipetować po 5 ml hodowli do suchych probówek, dodać 2 ml odczynnika Nesslera i przeprowadzić oznaczenie w kolorymetrze. Z uzyskanych wyników wykreślić krzywą.

W tabeli I zestawiono cyfry do wykreślenia krzywej standardowej.

Tabela I

Wyniki oznaczania lupaniny inkubowanej z *Pseudomonas lupanini*
Assay of lupanine by colorimetric determination of bacterial decomposition products

Lupanina, zawartość w mikrogramach w 5 ml próby Content of lupanine, μg per 5 ml	Absorpcja — Absorption /log I_o/I/							
	lupanina czysta — pure lupanine				lupanina po oddzieleniu jej metodą chemiczną od hydroksylupaniny lupanine after purification (without hydroxylupanine)			
	powtórzenia — experiments			średnio average	powtórzenia — experiments			średnio average
	I	II	III		I	II	III	
1000	0,5573	0,5850	0,5850	0,5791	0,5687	0,5850	0,5768	0,5768
800	0,4182	0,4203	0,4319	0,4235	0,4378	0,4319	0,4260	0,4319
500	0,2602	0,2758	0,2716	0,2692	0,2677	0,2758	0,2637	0,2677
400	0,1947	0,2041	0,2146	0,2045	0,2146	0,2183	0,2219	0,2183
200	0,1189	0,1193	0,1137	0,1173	0,1162	0,1189	0,1137	0,1162
100	0,0544	0,0457	0,0457	0,0486	0,0457	0,0480	0,0411	0,0457

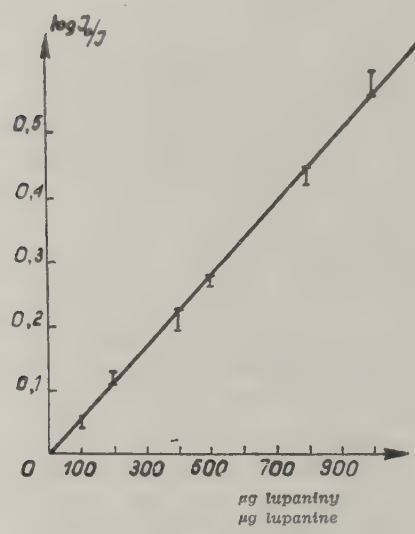
Na rysunku 1 przedstawiono krzywą standardową.

Optymalne warunki metody

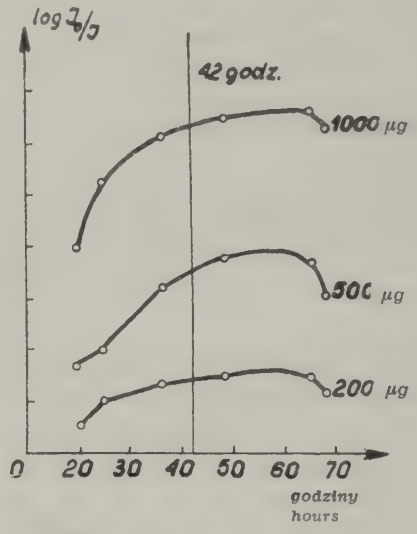
Powtarzalność wyników zależy od utrzymania temperatury, czasu inkubacji, dostępu powietrza do próby i stężenia fosforanów w pożywce.

Temperatura 27° jest temperaturą optymalną dla rozwoju *Pseudomonas lupanini* i podwyższenie jej do 30° powoduje obniżenie odczytów o około 35%.

Z wykonanych oznaczeń okazało się, że dla uzyskania optymalnych i powtarzalnych wyników konieczny jest 42-godzinny okres inkubacji. Dalsza inkubacja nieznacznie zwiększa nagromadzenie się produktów rozkładu reagujących z odczynnikiem Nesslera. Okres krótszy od 36 godzin charakteryzuje silne narastanie produktów reakcji, po 68 godzinach natomiast następuje spadek zawartości tych produktów (rys. 2).



Rys. 1



Rys. 2

Rys. 1. Wykres dla roztworów standardowych lupaniny. Fotokolorymetr Leitza, filtr C

Fig. 1. Standard curve for lupanine assay. Photocolorimetr Leitz, filter C

Rys. 2. Wpływ czasu inkubacji na wyniki ich powtarzalności

Fig. 2. Effect of time of incubation on the results of the lupanine assay

Dostatecznie duża powierzchnia inkubowanej próby ma także istotny wpływ na uzyskiwanie powtarzalnych wyników. Stwierdzono, że najlepsze wyniki otrzymuje się przez inkubację prób o objętości 10 ml w 50-mililitrowych kolbkach stożkowych. Oznaczenia przeprowadzone w probówkach (wysoki słup cieczy, mała powierzchnia) dają bardzo rozbieżne wyniki.

Zauważono także, że dla uzyskania powtarzalnych wyników konieczne jest odpowiednie stężenie fosforanów w pożywce. Najodpowiedniejsza jest pożywka zawierająca 0,6% mieszaniny fosforanów.

DYSKUSJA

Opisano zastosowanie *Pseudomonas lupanini* do ilościowego oznaczania lupaniny w czystych roztworach. Metoda oparta jest na spostrzeżeniu, że lupanina inkubowana z *Ps. lupanini* daje z odczynnikiem Nesslera zabarwienie o nasileniu proporcjonalnym do ilości rozłożonej lupaniny w pożywce. Reakcja ta nie wynika wyłącznie z obecności powstającego w czasie inkubacji amoniaku, lecz także z niezidentyfikowanych substancji reagujących z odczynnikiem Nesslera.

Opracowana metoda pozwala na oznaczanie lupaniny w granicach od 200 do 2000 mikrogramów w 10 ml pożywki.

Metoda ta nadaje się szczególnie do oznaczeń seryjnych, mimo że wymaga obecności względnie dużych ilości alkaloidu w próbie, gdyż w porównaniu z chemiczną metodą (Reifer i Niziołek 1957) jest prosta w użyciu i nie wymaga dodatkowej aparatury.

LITERATURA

Bucherer H., 1942: Über den mikrobiellen Abbau von Giftstoffen, Mitteilung I. *Zentr. Bakter. II,* **105**: 166.

Możejko-Toczko M., 1960: Rozkład lupaniny przez *Pseudomonas lupanini*. *Acta Microbiol. Polon.,* **9**: 157.

Reifer I., Niziołek S., 1957: Kolorymetryczna mikrometoda oznaczania alkaloidów w nasionach łubinu. *Acta Biochim. Polon.,* **1**: 16.

I. Reifer and *M. Możejko-Toczko*

MICROBIOLOGICAL ASSAY OF LUPANINE

Summary

The description is given of a new method of quantitative assay for lupanine with *Pseudomonas lupanini* as a test organism.

The products of bacterial decomposition of lupanine may be assayed colorimetrically with Nessler reagent. The intensity of the colour, in the given conditions, is proportional to the amount of decomposed lupanine (Table I, fig. 1 and 2).

This method is suitable for assaying fluids containing 200-2000 μg of lupanine per sample.

If lupanine is contaminated with hydroxylupanine, it should be purified by chemical method.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 157—171

M. Możejko-Toczko

ROZKŁAD LUPANINY PRZEZ *PSEUDOMONAS LUPANINI*

Z Zakładu Biochemii Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN
w Warszawie

Wpłynęło dnia 20 sierpnia 1959 r.

WSTĘP

Pierwsze wzmianki o możliwości rozkładu alkaloidów przez bakterie wiążą się z badaniami nad zagadnieniem fermentacji tytoniu (Behrens 1894, Fodor i Reifenberg 1926, Bodnar i Barta 1932, 1933a, 1933b, Faitelowitz 1930).

Batham (1927) badając zdolność nitryfikacyjną gleby, także zwraca uwagę na możliwość istnienia bakterii zdolnych do rozkładu alkaloidów.

Dopiero jednak praca wykonana przez Łypacewicz (1930) z Zakładu Fizjologii UW udowodniła istnienie bakterii rozkładających alkaloidy. W pracy tej wyizolowano 7 szczepów bakteryjnych zdolnych do rozkładu 7 alkaloidów. Szczepy te nie były uprzednio opisane i zostały nazwane odpowiednio do rozkładanych alkaloidów: *Bacterium atropini, B. strychnini, B. morphini, B. coniini* i *B. piridini.*

W kilkanaście lat później zagadnienie biologicznego rozkładu alkaloidów podjęli badacze niemieccy. Bucherer i Enders (1942) stwierdzili rozkład nikotyny wywoływany przez bakterie glebowe; jako produkty rozkładu znaleźli amoniak i metyloaminę. Bucherer (1942a) wyizolował z ziemi ogrodowej i szlamu rzecznego trzy nowe szczepy bakteryjne zdolne do rozkładu nikotyny: *B. nicotinovorum, B. nicotinophagum* oraz *B. nicotinibacter.* Wkrótce Bucherer (1942b) wyizolował jeszcze jeden szczep rozkładający nikotynę, nazywając go *B. nicotianum.*

W latach 1951-1952 autorka niniejszej pracy w Zakładzie Fizjologii Roślin UW opisała 11 szczepów bakteryjnych, zdolnych do rozkładu: atropiny, akonityny, kokainy, nikotyny i pierścienia pirydynowego (Mo-

żejko 1952, 1956). Próby klasyfikacji tych szczepów wykazały, że nie są one opisane w literaturze. Jednocześnie, w tym samym Zakładzie, Tomerska (1952) wyizolowała 11 szczepów bakteryjnych, wykazujących wzrost na 17 alkaloidach: akonitynie, atropinie, beladoninie, brucynie, chininie, cynchoninie, kodeinie, kokainie, koniinie, lupininie, morfinie, nikotynie, papawerynie, piperydynie, pirydynie, strychninie i tebainie.

Cytowane powyżej prace ograniczały się niemal wyłącznie do stwierdzenia, że istnieją mikroorganizmy zdolne do rozkładu alkaloidów. Dopiero w ciągu ostatnich kilku lat ukazały się prace, starające się wyjaśnić mechanizm mikrobiologicznego rozkładu nikotyny i nornikotyny (Frankenburg 1955, Frankenburg i Vaitekunas 1955, Wada i Yamasaki 1954, Wada 1956, 1957).

W dostępnej literaturze nie znaleziono danych o wyizolowaniu mikroorganizmów rozkładających alkaloidy łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.), lupaninę i hydroksylupaninę. W 1955 r. autorka niniejszej pracy wyizolowała szczep rozkładający lupaninę (Możejko 1955). W 1958 r. Nowacki doniósł o zdolności utleniania sparteiny przez bliżej nieokreślony szczep bakterii glebowych oraz grzyby *Fusarium culmorum, Aspergillus niger, A. terreus* i *Penicillium sp.*

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

CHARAKTERYSTYKA SZCZEPU *PSEUDOMONAS LUPANINI*. OTRZYMANIE CZYSTEJ KULTURY

W celu wyodrębnienia surowych kultur zastosowano pożywkę selektywną wg Bassalika, której używano już uprzednio do izolowania bakterii rozkładających alkaloidy (Możejko 1952). Skład pożywki:

0,03% KH_2PO_4
0,03% K_2HPO_4
0,05% $MgSO_4$
0,05% NaCl
ślady $FeCl_3$
0,1% alkaloidu (chlorowodorek lupaniny)
woda redestylowana.

Jako materiału zakaźnego używano ziemi z poletek doświadczalnych SGGW, na których był uprawiany łubin wąskolistny. Niejałową pożywkę (około 5 ml) w kolbkach Erlenmayera z korkiem z waty szczepiono niewielką ilością gleby (około 100 mg) i pozostawiano do inkubacji w 27°. Po dwóch dniach inkubacji nastąpiło zmętnienie pożywki. Materiał przenoszono na wyjałowioną pożywkę o tym samym składzie. Pasaż powtórzono jeszcze dwukrotnie. Analiza jakościowa pożywki po inkubacji wykazała ubytek w niej lupaniny.

W celu izolowania czystych kultur, selektywną pożywkę z dodatkiem 1% agaru, szczepiono bakteriami po czwartym pasażu i po 2-3 dobach inkubacji wyodrębniano czyste kultury. Kultury te przenoszono na skosy agarowe o iden-

tycznym składzie. Czystymi kulturami bakterii ze skosów ponownie szczepiono pożywkę płynną i oznaczano w niej ilościowo ubytek lupaniny metodą Reifera i Możejko (1954), w celu stwierdzenia czy wszystkie wyizolowane szczepy rozkładają ten alkaloid.

Wyodrębniono w ten sposób trzy szczepy bakteryjne zdolne do rozkładu lupaniny, dając im kolejne numery *1, 1a, 2*. Szczep nr *1* okazał się najbardziej aktywny i dlatego wybrano go do dalszej pracy (tab. I).

Tabela I

Rozkład lupaniny przez wyizolowane szczepy w temperaturze 27°, po 48 godzinach
Decomposition of lupanine at 27°C during 48-hours-incubation

Numer szczepu Strain №	Zawartość lupaniny w mg w pożywce Concentration of lupanine in the medium, mg		% rozkładu lupaniny p. c. of decomposed lupanine
	przed inkubacją before incubation	po inkubacji after incubation	
1	3,6	0,53	85,3
1a	3,6	0,89	75,3
2	3,6	0,97	73,1

OPIS MORFOLOGICZNY ORAZ KLASYFIKACJA *PSEUDOMONAS LUPANINI*

Szczep ten wyizolowano z gleby spod *Lupinus angustifolius* L. na pożywce selektywnej z lupaniną jako jedynym źródłem azotu i węgla.

Wygląd mikroskopowy: pałeczki pojedyncze lub podwójne o urzęsieniu monotrichialnym, ruchliwe na wszystkich pożywkach podstawowych oraz pożywce selektywnej, spor nie tworzą. Gramujemne. Na agarze z peptonem oraz na pożywce selektywnej, nie barwione posiadają wymiary 0,4×0,8μ.

Optymalne *pH wynosi* 6-7, temperatura optymalna, 27°, minimalna 3°, maksymalna 39°.

Na pożywce agarowej kolonie dwudniowe: okrągłe, wypukłe, barwy białej, o gładkiej powierzchni, błyszczące, o konsystencji mazistej. Średnica kolonii wynosi 1-2 mm. Brzeg kolonii gładki. Pod powiększeniem 100 razy kolonie wykazują ziarnistą strukturę.

Skos agarowy z glikozą i peptonem oraz skos agarowy z lupaniną: po 48 godzinach słaby wzrost o barwie białej, powierzchni gładkiej, błyszczącej.

Żelatyna kłuta: po 2 dobach słaby wzrost na powierzchni, po 8 dobach na powierzchni obfity kożuszek barwy beżowej, o konsystencji mazistej. Żelatyna nie ulega hydrolizie.

Ziemniak: po 24 godzinach słaby wzrost wzdłuż rysy, barwy lekko kremowej, o powierzchni gładkiej, błyszczącej, o konsystencji mazistej. Po 8 dniach cały ziemniak pokryty grubą warstwą beżowego nalotu. Komórki bakteryjne zaczynają degenerować.

Marchew: po 24 godzinach ledwie widoczny wzrost o barwie białej, który nie ulega zmianie po dalszym okresie inkubacji.

Woda peptonowa: po 2 dniach silne zmętnienie. Na powierzchni dosyć trwały, błoniasty kożuszek. Po 8 dniach na dnie probówki obfity osad. H_2S nie wydziela się.

Pożywka syntetyczna: po 24 godzinach jednolite zmętnienie pożywki, na powierzchni delikatny, błonkowaty kożuszek. Po 8 dniach pożywka staje się klarowna, a na dnie probówki powstaje osad w minimalnej ilości.

Mleko z lakmusem: po 2 dniach alkalizacja mleka, utrzymująca się przez cały okres obserwacji. Koagulacji ani hydrolizy nie zaobserwowano.

Azotanów do azotynów nie redukuje. Indolu nie tworzy. Szczep ten wykazuje wzrost na glikozie, nie rośnie na laktozie i sacharozie. Skrobi nie hydrolizuje.

Duży wpływ na szybkość rozkładu lupaniny ma temperatura inkubacji (tab. II).

Tabela II

Wpływ temperatury inkubacji na szybkość rozkładu lupaniny przez *Ps. lupanini*
Effect of temperature on the rate of lupanine decomposition by *Ps. lupanini*

Temperatura inkubacji Temperature	Okres inkubacji, dni Time of incubation, days	% rozkładu lupaniny p. c. of decomposed lupanine
18 - 20°	4	16,2
25°	4	47,1
27°	4	84,2

Cechą charakterystyczną tego szczepu jest zdolność utleniania przejściowo lupaniny do hydroksylupaniny. W literaturze nie znaleziono szczepu z taką charakterystyką. Według Bergeya (Bergey's Manual 1948) należy on do rodzaju *Pseudomonas*. Ze względu na własność rozkładania lupaniny został on nazwany *Pseudomonas lupanini*.

CHARAKTERYSTYKA PRODUKTÓW ROZKŁADU LUPANINY PRZEZ *PSEUDOMONAS LUPANINI*

250 ml pożywki selektywnej (patrz str. 158) sterylizowano 3-krotnie w aparacie Kocha po 30 minut w 500 mililitrowej kolbie Erlenmayera z korkiem z waty. Pożywkę zakażano ze skosu agarowego i inkubowano w 27° przez 4 doby w przypadku ustalania bilansu azotowego, oraz krócej lub dłużej dla innych oznaczeń. Z kolei pożywkę sączono przez sączek mikrobiologiczny Schott G5. Przesącz przechowywany w warunkach jałowych stanowił materiał wyjściowy do analizy. Materiałem kontrolnym był przesącz uzyskany z pożywki przygotowanej identycznie, lecz nie zakażonej bakteriami.

W pierwszych doświadczeniach zawartość lupaniny oznaczano metodą Reifera i Możejko (1954). W dalszych doświadczeniach do oznaczania lupaniny

i hydroksylupaniny zastosowano metodę Reifera i Niziołka (1957), w której oddzielano lupaninę od hydroksylupaniny metodą chromatograficzną Wiewiórowskiego i Bratek (1957). W celu oznaczenia alkaloidów badaną próbę nakraplano ilościowo mikropipetą na krążki bibuły Whatman nr 1 o średnicy 18 cm. W miejscu nakroplenia próby nanoszono oczkiem (1-2 oczka) 0,1 N HCl i rozwijano chromatogram dwukrotnie w n-butanolu nasyconym wodą. Po rozwinięciu chromatogramu suszono go na powietrzu i wywoływano odczynnikiem Dragendorffa, zmodyfikowanym wg Muniera i współpracowników (Bettschart 1954). Wywoływane prążki alkaloidu wycinano z chromatogramu, cięto na drobne paski, przenoszono do rozdzielacza, alkalizowano około 0,5 ml 5N NaOH i ekstrahowano alkaloid chloroformem. W wyciągu chloroformowym oznaczano alkaloid metodą Reifera i Niziołka (1957).

W celu identyfikacji powstającej w czasie rozkładu substancji o charakterze alkaloidowym, zastosowano dodatkowo fazę chromatograficznego rozdziału alkaloidów wg Reifera, Przeździeckiej i Kleczkowskiej (1959).

Azot ogólny oznaczano metodą podbrominową Reifera i Tarnowskiej (1950).

Do oznaczania azotu amonowego zastosowano zmodyfikowaną przez Reifera i Tarnowską (1952) metodę Puchera i współpracowników (1935).

Azot aminokwasowy oznaczano metodą van Slyke (Klein 1933); ponadto do celów jakościowych stosowano chromatografię bibułową aminokwasów.

Celem pierwszych czterech doświadczeń były próby ustalenia bilansu azotowego rozkładu lupaniny. W tabeli III zestawione są wyniki oznaczeń lupaniny w pożywce przed inkubacją i po 4 dniach inkubacji. Równolegle podana jest wyliczona zawartość azotu alkaloidowego. Bezpośrednie oznaczenie azotu w pożywce przed inkubacją pokrywa się z ilością azotu wyliczoną z ilości zawartych w pożywce alkaloidów. Jak widać z tabeli III, procentowy rozkład lupaniny we wszystkich doświadczeniach jest bardzo podobny.

Tabela III

Rozkład lupaniny w temperaturze 27° w ciągu 96 godzin inkubacji
Decomposition of lupanine at 27°C during 96-hours-incubation

Nr doświadczenia Experiment №	Zawartość lupaniny w mg na 100 ml przesączu Content of lupanine, mg per 100 ml of filtrate		% rozkładu lupaniny p. c. of decomposition of lupanine	Azot alkaloidu w mg na 100 ml przesączu przed inkubacją N content per 100 ml of filtrate before incubation	
	przesącz nieszczepiony not inoculated	przesącz szczepiony inoculated		obliczony calculated	oznaczony measured
I	72,9	10,8	85,2	8,2	8,3
II	53,9	6,6	87,9	6,0	5,7
III	72,9	10,8	85,2	8,2	8,1
IV	51,6	6,8	86,9	5,8	5,8

W tabeli IV zestawione są wyniki oznaczeń azotu ogólnego w pożywce nieszczepionej i po 4 dniach inkubacji. Ubytek azotu wynika z asymilacji azotu przez bakterie odsączone z badanego roztworu. Jak wynika z tabeli IV, procentowa zawartość azotu w przesączu waha się w granicach 57-73% azotu wprowadzonego w postaci lupaniny.

Tabela IV

Zestawienie zawartości azotu w przesączu nieszczepionym i po 96 godzinach inkubacji (mg na 100 ml)

N content of culture filtrate before and after incubation (96 hours — mg per 100 ml)

Nr doświadczenia Experiment №	Azot ogólny, mg na 100 ml N total (per 100 ml)	
	pożywki nieszczepionej medium not inoculated	przesączu po inkubacji filtrate after incubation
I	8,3	4,7 (56,7%)
II	5,7	4,2 (73,7%)
III	8,1	5,6 (69,2%)
IV	5,8	3,9 (67,3%)

Tabela V

Frakcje azotowe w 100 ml przesączu po 96 godzinach inkubacji

Nitrogen content of the culture filtrate after 96-hours incubation (per 100 ml)

Azot ogólny mg N-total mg	Azot alkaloidowy N — alcaloids		Azot — NH_3 Nitrogen — NH_3		Azot związków niezidentyfikowanych N in not identfied compounds	
	mg	w % azotu ogólnego p. c. of N-total	mg	w % azotu ogólnego p. c. of N-total	mg mg	w % azotu ogólnego p. c. of N-total
1	2	3	4	5	6	7
4,7	1,2	25,5	0,4	8,5	3,1	66,0
4,2	0,7	16,6	0,4	9,5	3,1	73,9
5,6	1,2	21,4	—	—	—	—
3,9	0,7	18,0	0,3	7,7	2,9	74,3

Następnie badano w przesączu bakteryjnym zawartość pozostałych alkaloidów i amoniaku. Jak wynika z tabeli V, poza alkaloidami i amo-

niakiem, w przesączu wykryto znaczne ilości azotu rozpuszczalnego. Rubryka 6 w tabeli V odpowiada azotowi związków niezidentyfikowanych. Związki te stanowią główny składnik przesączu po inkubacji i zawierają 66-73% azotu ogólnego w roztworze.

W doświadczeniu IV (tab. VI), poza oznaczeniem azotu ogólnego i amonowego w przesączu po inkubacji, usiłowano stwierdzić, czy oprócz substancji alkaloidowych znajdują się w przesączu inne substancje azotowe, dające się podobnie jak alkaloidy wyekstrahować chloroformem z wody jako zasady i w postaci soli z chloroformu do rozcieńczonego kwasu. W tym celu przesącz po inkubacji alkalizowano i ekstrahowano chloroformem. Frakcję chloroformową ekstrahowano następnie rozcieńczonym kwasem solnym i w każdej z tej frakcji oznaczano azot ogólny. Jak widać z tabeli VI, 61,0% azotu ogólnego pochodzi z substancji nie ekstrahujących się do chloroformu (frakcja I), a 39,0% azotu ekstrahuje się do chloroformu w środowisku alkalicznym (frakcja II) i po zakwaszeniu przechodzi do kwasu (frakcja III). 50% azotu frakcji III przypada na nierozłożone alkaloidy, 19,7% (77% N ogólnego) na azot amoniaku, wobec tego azot związków niezidentyfikowanych w tej frakcji wynosi 30,3% (13,32% N ogólnego). Ze względu na ich własność ekstrahowania się do chloroformu z wody alkalicznej i przechodzenia z chloroformu do wody zakwaszonej, przypuszcza się, że muszą to być zasady organiczne.

Tabela VI

Rozmieszczenie azotu w poszczególnych frakcjach w przesączu po inkubacji (mg na 100 ml)

N fractions in the culture filtrate after incubation (mg per 100 ml)

Azot Nitrogen				
ogólny N-total	frakcji I fraction I	frakcji II fraction II	frakcji III fraction III	ogólny, obliczony z sumy frakcji I, II i III N-total calculated from fractions , II, III.
3,9	2,4	0,0	1,52	3,92

W przesączu bakteryjnym wykonano także oznaczenia alkaloidów metodą chromatograficzną wg Wiewiórowskiego i Bratek (1957). Okazało się, że po inkubacji obok nierozłożonej lupaniny pojawia się drugi alkaloid. Położenie jego na chromatogramie odpowiada położeniu hydroksylupaniny. W celu dokładniejszej identyfikacji pojawiającego się w czasie inkubacji produktu, zastosowano dodatkowo rozdział chromatograficzny wg Reifera i współpracowników (1959).

Stwierdzono, że powstający produkt jest hydroksylupaniną, przez wydzielenie chlorowodorku hydroksylupaniny z przesączu i określenie jego punktu topnienia.

W świetle tej interesującej obserwacji wydawała się celowa analiza przesączu po różnych okresach inkubacji. Przeanalizowano ilościowo rozkład lupaniny po 1, 2, 3, 4, 7 i 11 dniach inkubacji. Wyniki tych doświadczeń zestawiono w tabeli VII i VIII. Jedno doświadczenie wykonano w 25°, drugie w 18-20°. Jak widać z tabeli VII rozkład lupaniny w 18-20° jest przeszło dwukrotnie wolniejszy aniżeli w 25°. W jednym i drugim przypadku w czasie inkubacji pojawia się hydroksylupanina, która po osiągnięciu pewnego stężenia ulega dalszemu rozkładowi do produktów niealkaloidowych.

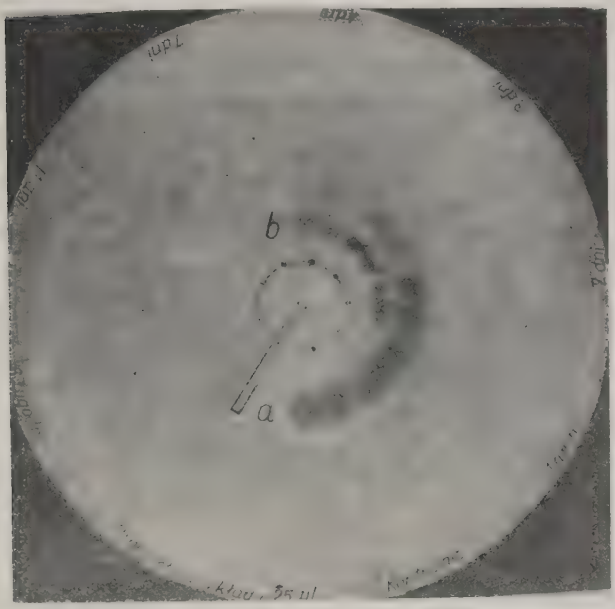
Tabela VII

Rozkład lupaniny po 1, 2, 3, 4, 7 i 11 dniach inkubacji (oznaczenia metodą Reifera i Możejko)

Decomposition of lupanine during 11 days of incubation (assay by method of Reifer and Możejko)

Temperatura inkubacji Temperature	Czas inkubacji, dni Time of incubation, days	Zawartość mg na 100 ml Content — mg per 100 ml		Razem Total	Ubytek lupaniny w mg na 100 ml próby Decrease in lupanine content mg per 100 ml
		lupaniny lupanine	hydroksylupaniny hydroxylupanine		
25°	kontrolna	100,25	0,00	100,25	0,00
	1	85,40	16,25	101,65	14,85
	2	54,95	43,10	98,05	45,30
	3	50,50	35,45	86,25	49,75
	4	24,95	28,10	53,05	75,30
18-20°	kontrolna	79,75	0,00	79,75	0,00
	4	43,95	22,87	66,82	35,80
	7	26,14	33,37	56,51	53,61
	11	0,00	14,37	14,37	79,75

Doświadczenie to powtórzono następnie w temperaturze optymalnej dla rozwoju *Ps. lupanini* (27°). Wyniki zestawiono w tabeli VIII i uzupełniono chromatogramem, wykonanym równolegle do oznaczeń. Na chromatogramie widać wyraźny prążek lupaniny w pożywce kontrolnej, zanikający stopniowo w miarę czasu inkubacji. Po pierwszym dniu inkubacji pojawia się prążek hydroksylupaniny, którego intensywność wzrasta w drugim i trzecim dniu, a począwszy od czwartego dnia zaczyna zanikać. Po siódmym dniu pożywka nie zawiera ani lupaniny ani hydroksylupaniny (fot. 1).



Fot. 1. Chromatogram hodowli *Ps. lupanini* po 1, 2, 3, 4, 7, 11 i 42 dniach inkubacji; a — lupanina, b — hydroksylupanina

Phot. 1. Chromatogram of the culture of *Ps. lupanini* after 1, 2, 3, 4, 7 11 and 42 days of incubation; a — lupanine, b — hydroxylupanine

Z przytoczonych cyfr (tab. VIII) wynika, że 50% rozkładu lupaniny przez *Ps. lupanini* w 27° przypada na 1 i 2 dzień inkubacji, po 4 dniach ubytek lupaniny wynosi około 90%, a po upływie 7 dni lupaniny już nie wykryto. Hydroksylupanina zaczyna pojawiać się w pożywce już po 1 dniu inkubacji, po 3 osiąga maksymalną wartość, po 4 spada do połowy maksymalnej swej wartości, a po 7 jest całkowicie rozłożona.

Hydroksylupanina jest bardziej utlenioną formą lupaniny. Pierwszy etap rozkładu lupaniny polega prawdopodobnie na utlenieniu jej do hydroksylupaniny, która następnie ulega rozkładowi do produktów jeszcze niezidentyfikowanych.

Opisany drobnoustrój nie rozwija się na pożywce zawierającej hydroksylupaninę jako jedyne źródło azotu i węgla, mimo że rozkład lupaniny przebiega poprzez utlenienie jej do hydroksylupaniny.

Ta ciekawa i nieoczekiwana obserwacja była podstawą do przebadania rozkładu lupaniny w obecności dodanej hydroksylupaniny. Do poży-

Tabela VIII

Rozkład lupaniny po 1, 2, 3, 4, 7 i 11 dniach inkubacji (oznaczanie metodą Reifera i Niziołka)
Decomposition of lupanine during 11 days of incubation (assay by method of Reifer and Niziołek)

Czas inkubacji w dniach Time of incubation, days	Zawartość—Content, mg per 100					
	lupaniny		hydroksylupaniny		razem—total	
	a	b	a	b	a	b
kontrolna	82,80	82,80	0,00	0,00	82,80	82,80
1	45,36	41,60	1,92	1,80	47,28	43,40
2	42,60	36,00	10,08	7,56	52,68	43,56
3	15,96	15,60	11,76	13,44	27,72	29,04
4	7,72	4,32	5,76	8,76	13,48	13,08
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

a — Doświadczenie a — Experiment a
b — Doświadczenie b — Experiment b

wek o różnych znanych zawartościach lupaniny dodano ściśle określone ilości hydroksylupaniny. Objętość pożywek we wszystkich wypadkach wynosiła 10 ml. Pożywki te inkubowano z *Ps. lupanini* i analizowano po 3 i 5 dniach inkubacji w 27°. Wyniki podano w tabeli IX.

Tabela IX

Wpływ zawartości hydroksylupaniny na szybkość mikrobiologicznego rozkładu lupaniny
Effect of hydroxylupanine on bacterial decomposition of lupanine

Zawartość przed inkubacją, mg Content before incubation, mg		Po trzech dniach After 3 days of incubation				Po pięciu dniach inkubacji After 5 days of incubation			
		lupanina		hydroksylupanina		lupanina		hydroksylupanina	
lupanina	hydroksylupanina	wykryto w pożywce w mg content	ubytek w mg decrease	wykryto w pożywce w mg content	ubytek w mg decrease	wykryto w pożywce w mg content	ubytek w mg decrease	wykryto w pożywce w mg content	ubytek w mg decrease
2,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00
1,50	0,50	0,00	1,50	0,024	0,476	0,00	1,50	0,00	0,50
1,00	1,00	ślady	1,00	0,096	0,904	0,00	1,00	0,135	0,865
0,50	1,50	0,444	0,056	0,360	1,140	ślady	0,50	0,195	1,305
0,25	1,75	0,090	0,160	0,630	1,120	0,054	0,196	0,255	1,495
0,00	2,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,000	0,00	2,00	0,00

Jak wynika z tabeli IX, hydroksylupanina inkubowana w obecności *Ps. lupanini* bez lupaniny nie ulega rozkładowi, natomiast w obecności nawet małych ilości lupaniny (stosunek lupaniny do hydroksylupaniny 1 : 7) ulega rozkładowi w 85,5%.

Z drugiej strony obecność hydroksylupaniny wpływa hamująco na rozkład lupaniny, szczególnie gdy lupanina obecna jest w małych, a hydroksylupanina w dużych ilościach. Jak wynika z tabeli IX, 2 mg lupaniny po upływie 3 dni inkubacji ulega rozkładowi w 100%, podczas gdy 0,25 mg lupaniny w obecności 1,75 mg hydroksylupaniny ulega rozkładowi zaledwie w 64%.

Wśród alkaloidów łubinowych znane są 3 alkaloidy o podobnej budowie chemicznej, różniące się tylko stopniem utlenienia, a mianowicie sparteina — $C_{15}H_{26}N_2$, lupanina — $C_{15}H_{24}ON_2$, hydroksylupanina — $C_{15}H_{24}O_2N_2$. Fakt, że bakterie *Ps. lupanini* utleniają lupaninę do hydroksylupaniny nasunął pytanie, czy nie byłyby one zdolne utleniać także i sparteiny do lupaniny. W tym celu wykonano doświadczenie w którym do pożywki zamiast lupaniny dodano sparteinę, oraz drugie, w którym do pożywki o znanej ilości lupaniny dodano znane ilości sparteiny. Wyniki podano w tabeli X.

Tabela X

Wpływ lupaniny na rozkład sparteiny przez *Ps. lupanini*
Effect of lupanine on sparteine decomposition by *Ps. lupanini*

Zawartość alkaloidów, µg na 5 ml pożywki Content of alkaloids, µg per 5 ml of medium										
przed inkubacją-before incubation		po inkubacji—after incubation								
		1 dniu — 1 day			3 dniach — 3 days			5 dniach — 5 days		
lupanina	sparteina	lupanina	sparteina	hydroksylupanina	lupanina	sparteina	hydroksylupanina	lupanina	sparteina	hydroksylupanina
—	1057	0	1057	0	0	1040	0		1060	0
1074	5140	1020	2675	348	0	2560	1930	0	2450	1800
1074	1057	0	450	318	0	0	0	0	0	0
1074	768	0	534	306	0	0	0	0	0	0
1074	564	0	432	306	0	0	0	0	0	0

Jak wynika z tabeli X, sparteina inkubowana z *Ps. lupanini* nie ulega rozkładowi. Natomiast w obecności lupaniny, podobnie jak w przypadku hydroksylupaniny (tab. IX), sparteina ulega rozkładowi w około 50% przy dużych jej stężeniach oraz całkowicie przy stężeniach niższych.

Proces rozkładu sparteiny pod wpływem *Ps. lupanini* przebiega poprzez utlenienie jej do lupaniny i hydroksylupaniny, która pojawia się

już po 1 dniu inkubacji. Po 3 dniach inkubacji zawartość hydroksylupaniny wynosi około 2 mg, co wskazuje, że nie mogła ona powstać wyłącznie z utlenienia lupaniny dodanej do pożywki (dodano około 1 mg), ale także ze sparteiny.

Wyniki te znajdują potwierdzenie w krótkotrwałych doświadczeniach z zawiesiną *Ps. lupanini*. Zestawiono je w tabeli XI.

Tabela XI

Rozkład sparteiny, lupaniny i hydroksylupaniny w krótkotrwałych doświadczeniach z zawiesiną *Ps. lupanini*

Decomposition of sparteine, lupanine and hydroxylupanine by *Ps. lupanini* suspension

Zawartość alkaloidów w μg na 1 ml — Content of alkaloids, μg per 1 ml															
Kontrola Control			Po inkubacji (godziny) — after incubation (hours)												
			1,5			3,0			4,5			6,0			
S	L	H	S	L	H	S	L	H	S	L	H	S	L	H	
—	1085*	—	nie badano			—	620,0	430	nie badano						
—	1250	—	—	990	ślad	—	975	27	—	900	39	—	705	107	
—	—	1300	—	—	1300	—	—	1300	—	—	1344	—	—	1304	
400	—	—	408	—	—	392	—	—	408	—	—	384	—	—	

* — oznaczenie wykonane na zawiesinie bezpośrednio przyrządzonej. Pozostałe doświadczenia były wykonane na zawiesinie przechowywanej 2 doby w lodówce (temperatura 3°).

* — experiments conducted on freshly made bacterial suspension. In other experiments suspensions stored for 2 days at 3°C were used.

S — sparteina, L — lupanina, H — hydroksylupanina.

Zdolność rozkładu lupaniny przez enzymy *Ps. lupanini* została udowodniona w przekonywający sposób w doświadczeniu z dużą ilością zawiesiny bakteryjnej. W doświadczeniu krótkotrwałym nie przekraczającym 6 godzin wykazano, że lupanina uległa rozkładowi w około 45%, podczas gdy w tych warunkach sparteina i hydroksylupanina pozostały niezmienione. Wyniki podano w tabeli XI. Uzyskano także proszek acetonowy z *Ps. lupanini*, który powodował rozkład lupaniny. Dalsza praca w toku.

DYSKUSJA

W literaturze nie znaleziono wzmianki o wykryciu mikroorganizmów rozkładających alkaloidy łubinu wąskolistnego: lupaninę i hydroksylupaninę.

W niniejszej pracy poddano szczegółowym badaniom wyizolowany przez nas w 1955 r. szczep, który okazał się szczepem nowym, w literaturze nie opisanym. Według Bergeya należy on do rodzaju *Pseudomonas*. Jego charakterystyczną cechą jest zdolność korzystania z lupaniny jako jedynego źródła azotu i węgla.

W celu identyfikacji produktów rozkładu lupaniny dokonano próby określenia bilansu azotowego. Bilans azotowy przeprowadzono po 4 dobach inkubacji. Należy podkreślić, że był to dowolnie wybrany punkt (85% rozkładu alkaloidu). Analiza wykonana po innych okresach inkubacji wykazałaby inny obraz rozmieszczenia azotu w badanych frakcjach.

Stwierdzono, że poza amoniakiem i nierozłożonymi alkaloidami występują związki niezidentyfikowane, stanowiące 2/3 ogólnej zawartości azotu w przesączu po inkubacji. 13% tego azotu pochodzi prawdopodobnie z niezidentyfikowanych zasad organicznych.

Ps. lupanini rozwijając się na czystej lupaninie utlenia ją początkowo do hydroksylupaniny, która następnie ulega dalszej przemianie do związków niealkaloidowych.

Godne uwagi są, w związku z tym, wyniki pracy Nowackiego (1958), który wyizolował z gleby bliżej nie określony drobnoustrój, powodujący utlenianie sparteiny do lupaniny. Stwierdził on również, że sparteina ulega przekształceniu na lupaninę pod wpływem grzybów *Fusarium culmorum, Aspergillus niger, A. terreus* i *Penicillium sp.*

Rola hydroksylupaniny w procesie mikrobiologicznego rozkładu lupaniny jest niewyjaśniona. Stwierdzono, że *Ps. lupanini* nie rozwija się na pożywce zawierającej samą hydroksylupaninę i nie rozkłada jej wówczas. Powoduje natomiast rozkład hydroksylupaniny jeżeli w pożywce znajdują się nawet niewielkie ilości lupaniny.

Zagadnienie to staje się tym bardziej interesujące, że podobnie zachowuje się sparteina, do której rozkładu przez *Ps. lupanini* niezbędna jest obecność lupaniny.

Spostrzeżenie to wyraźnie potwierdzają krótkotrwałe doświadczenia z zawiesiną bakteryjną, w których z 3 alkaloidów: sparteiny, lupaniny i hydroksylupaniny, poddanych 6-godzinnej inkubacji, tylko lupanina ulega utlenieniu do hydroksylupaniny, podczas gdy sparteina i hydroksylupanina pozostają niezmienione.

Zjawisko to wskazuje raczej na specyficzny rodzaj reakcji. Jest to odmienne od wniosków Piechowskiego i Nowackiego (1959), którzy badając wyciągi z łubinu wąskolistnego, wyki i chrzanu stwierdzili utlenienie sparteiny do alkaloidu o *Rf* lupaniny i uważali, że reakcja utleniania sparteiny ma charakter niespecyficzny.

Z analizy wykorzystania mieszaniny lupaniny i hydroksylupaniny przez *Ps. lupanini* wynika, że drobnoustrój ten korzysta w równej mierze z obu alkaloidów, pobierając je proporcjonalnie w stosunku w jakim zostały one dodane do pożywki.

To samo dotyczy mieszaniny lupaniny i sparteiny, przy czym duża ilość powstałej hydroksylupaniny (przekraczająca ilość dodanej do pożywki lupaniny) wskazuje na to, że proces rozkładu sparteiny musi prze-

biegać poprzez utlenienie jej do lupaniny i hydroksylupaniny, zgodnie z hipotezą dotyczącą syntezy tych alkaloidów w łubinie (Woker 1953).

Rola lupaniny w przemianie sparteiny i hydroksylupaniny nie jest jeszcze wyjaśniona i zagadnienie to jest przedmiotem dalszej pracy.

LITERATURA

Batham H. N., 1927: Nitrification in soils. *Soil Sci.*, **24**: 187.

Behrens J., 1894: Weitere Beiträge zur Kenntnis der Tabakpflanze. *Land. Vers. Stat.*, **43**: 271.

Bergey's Manual of determinative bacteriology, 1948, London.

Bettschart A., 1954: Über die Eignung chromatographischer Verfahren für die Trennung von Alkaloidgemischen unter besonderer Berücksichtigung der Tropin- und der Opiumalkaloide. Zürich (praca doktorska).

Bodnar J., Barta L., 1932: Biochemische Untersuchung der Tabaktrocknung und -Fermentation. Mitt. I. *Biochem. Z.*, **247**: 218.

Bodnar J., Barta L., 1933a: Biochemische Untersuchung der Tabaktrocknung und -Fermentation. Mitt. II. *Biochem. Z.*, **257**: 406.

Bodnar J., Barta L., 1933b: Biochemische Untersuchung der Tabaktrocknung und -Fermentation. Mitt. III. *Biochem. Z.* **265**: 386.

Bucherer H., 1942a: Über den mikrobiellen Abbau von Giftstoffen. Mitt. I. *Zentr. Bakter. II*, **105**: 166.

Bucherer H., 1942b: Über den mikrobiellen Abbau von Giftstoffen. Mitt. II. *Zentr. Bakter II*, **105**: 445.

Bucherer H., Enders C., 1942: Abbau von Histamin und Nicotin durch Bakterien. *Biochem. Z.*, **310**: 22.

Faitelowitz A., 1930: Zur Kenntnis der Nikotinabbaus im Tabak. *Biochem. Z.*, **224**: 460.

Fodor A., Reifenberg A., 1926: Über die Atmungserscheinungen während der Trocknung von Tabakblättern und über das Wesen der sogenannten Tabakfermentation. *Z. Physiol. Chem.*, **162**: 1.

Frankenburg W. G., 1955: Nicotine degradation *in vitro* induced by agents from tobacco seed. *Nature*, **175**: 945.

Frankenburg W. G., Vaitekunas A. A., 1955: Chemical studies on nicotine degradation by microorganisms derived from the surface of tobacco seeds. *Arch. Biochim. Biophis.*, **58**: 509.

Klein G., 1933: Handbuch der Pflanzenanalyse. Tom IV, cz. III, zeszyt 1.

Lypacewicz J., 1930: Rozkład alkaloidów przez bakterie. *Acta Soc. Botan. Polon.*, **7**: 452.

Możejko M., 1952: Rozkład alkaloidów przez mikroorganizmy glebowe. Praca magisterska (maszynopis) z Zakładu Fizjologii Roślin UW.

Możejko M., 1955: The use of soil bacteria for the microbiological determination of lupine alkaloids. *III Congr. Int. Biochimie*. Bruksela: 104.

Możejko M., 1956: Rozkład alkaloidów przez mikroorganizmy glebowe. *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 211.

Nowacki E., 1958: Badania nad syntezą alkaloidów w łubinie. *Roczn. Nauk Roln.*, **79-A**: 505.

Piechowski M., Nowacki E., 1959: Enzymatic oxidation of spartein. *Bull. Acad. Polon. Sci.*, seria *Sci. Biol.*, **5**: 165.

Pucher G. W., Vickery H. B., Leavenworth Ch. S. 1935: Determination of ammonia and of amine in plant tissue. *Ind. Eng. Chem. Anal* Wyd. 7, 1952.

Reifer I., Możejko M., 1954: Nowa mikrometoda ilościowego oznaczania alkaloidów w łubinach pastewnych. *Acta Biochim. Polon.*, **1**: 197.

Reifer I., Niziołek S., 1957: Kolorymetryczna mikrometoda oznaczania alkaloidów w nasionach łubinu. *Acta Biochim. Polon.*, **4**: 165.

Reifer I., Przeździecka J., Kleczkowska D., 1959: Chromatograficzna metoda ilościowego oznaczania alkaloidów łubinowych. *Acta Biochim. Polon.*, **6**: 17.

Reifer I., Tarnowska K., 1950: Mikrojodometryczne oznaczanie azotu ogólnego. *Acta Soc. Botan. Polon.*, **20**: 739.

Reifer I., Tarnowska K., 1952: Mikrooznaczanie glutaminy w materiale roślinnym. *Roczn. Nauk Roln.*, **61**: 233.

Tomerska H., 1952: Rozkład alkaloidów przez mikroorganizmy glebowe. Praca magisterska (maszynopis) z Zakładu Fizjologii Roślin UW.

Wada E., 1956: Microbial degradation of nornicotine. *Arch. Biochim. Biophys.* **64**: 244.

Wada E., 1957: Microbial degradation of the tobacco alkaloids and some related compounds. *Arch. Biochim. Biophys.*, **72**: 145.

Wada E., Yamasaki K., 1954: Degradation of nicotine by soil bacteria. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**: 155.

Woker G., 1953: Die Chemie der natürlichen Alkaloide. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

Wiewiórowski M., Bratek M. D., 1957: Die qualitative Alkaloidszusammensetzung der Lupine im Lichte chromatographischer Untersuchungen. *Acta Soc. Botan. Polon.*, **26**: 129.

M. Możejko-Toczko

DECOMPOSITION OF LUPANINE BY *PSEUDOMONAS LUPANINI*

Summary

Author isolated a new bacterial strain, which utilizes lupanine as only source of carbon and nitrogen. The detailed description of this strain is given. It have been placed in the genus *Pseudomonas*. According to its distinctive character it was named *Pseudomonas lupanini*.

P. lupanini is able to perform the aerobic oxidation of lupanine. Hydroxylupanine is an intermediate in this process. The final products (beside NH_4^+) were not identifyied. It was shown that *P. lupanini* is able to utilize hydroxylupanine, as well as spartein, only in the presence of lupanine.

The oxidation of lupanine was also observed with rest bacterial suspension and with acetone powder.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9: 173-179

J. Kączkowski i *M. Możejko-Toczko*

BAKTERIE ROZKŁADAJĄCE ALKALOIDY TROPANOWE

Z Katedry Biochemii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
i z Zakładu Biochemii Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

Wpłynęło dnia 21 września 1959 r.

Spotykane w starszej literaturze wzmianki na temat możliwości rozkładania alkaloidów przez bakterie glebowe dały pomysł dla szeregu prac nad tym zagadnieniem, wykonanych w Zakładzie Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego. W toku badań wyizolowano i opisano liczne szczepy bakterii, zdolnych ro rozkładania wielu zasad organicznych, w tym znanych alkaloidów (Łypacewicz 1930, Możejko 1952, Tomerska 1952).

Ostatnio zajmował się tym zagadnieniem Küster (1952). Wszyscy wymienieni autorzy wyizolowali szczepy bakterii, rozkładających również alkaloidy tropanowe, nie identyfikowali jednak produktów rozkładu ani tych, ani wszystkich innych badanych zasad.

Identyfikacją produktów rozkładu bakteryjnego alkaloidów zajęli się w Polsce Możejko-Toczko (1959) odnośnie alkaloidów łubinowych, oraz Kączkowski (1960) odnośnie alkaloidów tropanowych, natomiast w Stanach Zjednoczonych Frankenburg (1955), Frankenburg i Vaitekunas (1955), Wada i Yamasaki (1954), Wada (1956 i 1957), odnośnie alkaloidów tytoniu.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

IZOLOWANIE CZYSTYCH SZCZEPÓW BAKTERII Z GLEBY

Próbki gleby pobrano z pola doświadczalnego SGGW, na którym w poprzednim roku prowadzono hodowlę doświadczalną bielunia (*Datura stramonium L*). Zawiesinę gleby przeniesiono do selektywnej pożywki o składzie podanym przez Bassalika (Możejko-Toczko 1959) z dodatkiem 0,02% siarczanu atropiny. Alkaloid stanowił jedyne źródło azotu i węgla. Po kilku pasażach w pożywce selektywnej, zawiesinę bakterii przeniesiono do analogicznej pożywki z dodatkiem 1,4% agaru i wylano na szalki Petriego. Na szalkach uzyskano 2 rodzaje kolonii, odpowiadające dwom niżej opisanym szczepom.

Uzyskane w ten sposób czyste kolonie obu szczepów przeniesiono do pożywki selektywnej, po czym przeszczepiono na skosy agarowe i w takiej postaci je przechowywano.

a. Szczep nr 1

Wygląd mikroskopowy: niewielkie, nieruchliwe pałeczki o końcach zaokrąglonych i bokach nierównoległych, układające się w różne figury geometryczne (np. w kształcie litery V). Wymiary: 0,6-0,9×3 μ. Po 4-5 dniach następuje degeneracja i rozpad komórek.

Wygląd kolonii na agarze: kolonie okrągłe, błyszczące, o brzegach gładkich, strukturze jednolitej; zabarwienie początkowe żółtawe, następnie ciemniejące, aż do odcienia czerwonawopomarańczowego; konsystencja mazista. Po 3 dobach wymiary kolonii wynosiły 2-3 mm.

Skos agarowy z atropiną: po 2 dniach wzrost wzdłuż rysy o barwie pomarańczowożółtej, powierzchni gładkiej, błyszczącej, linii brzegowej gładkiej i konsystencji mazistej.

Skos agarowy z glikozą: jak wyżej.

Żelatyna kłuta: w ciągu 12 dni wzrostu nie stwierdzono.

Ziemniak: po 2 dniach wzrost rozlany o powierzchni gruzełkowatej, matowej, barwie pomarańczowej i konsystencji mazistej.

Marchew: po 3 dniach komórki wyraźnie degenerują. Po 12 dniach wzrost prawie niewidoczny.

Woda peptonowa: wrostu nie stwierdzono.

Pożywka syntetyczna: po 2 dniach słabe zmętnienie i delikatny, błoniasty kożuszek. W ciągu dalszych 10 dni nieznaczny przyrost zmętnienia i kożuszka oraz opadanie żółtego osadu bakterii.

Mleko z lakmusem: po 2 dniach słaby wzrost. Po 12 dniach na powierzchni pomarańczowy kożuszek, na dnie osad tej samej barwy, odczyn lekko zasadowy. Hydrolizy białka i skrzepu nie stwierdzono.

Białko: Po 2 dniach wzdłuż rysy silny wzrost o barwie pomarańczowej, powierzchni gładkiej, błyszczącej, linii brzegowej pofałdowanej. Hydrolizy białka i wydzielania barwnika do podłoża nie stwierdzono.

Opisany szczep jest gramdodatni. Nie wykazuje wzrostu na pożywce azotanowej oraz na peptonie. Na pożywkach peptonowych z glikozą, sacharozą, laktozą, glicerolem i mannitolem obserwowano silny wzrost, natomiast na analogicznych pożywkach bez peptonu słabszy — silny jedynie w przypadku glikozy, glicerolu i mannitolu. Skrobi nie hydrolizuje. Spor nie wytwarza. Optymalna temperatura 27°, optymalne *pH* — 5,2.

Szczep ten rozkłada alkaloidy tropanowe (np. atropinę), przy czym w pierwszym rzędzie następuje hydroliza estru do kwasu tropowego i tropiny, a ta ostatnia ulega demetylacji do tropigeniny (Kączkowski 1959).

Aktywność opisanego szczepu jest różna w stosunku do różnych rodzajów alkaloidów tropanowych. Tabela I podaje szybkość rozkładu kilku ważniejszych alkaloidów tej grupy pod działaniem wyizolowanych bakterii.

Szybkość rozkładania tych alkaloidów jest zależna od temperatury inkubacji i od odczynu stosowanej pożywki. Zależności te dla rozkładu atropiny przedstawione są w tabelach II i III.

Tabela I

Szybkość rozkładu alkaloidów tropanowych przez szczep nr 1 w temperaturze 28°

Decomposition of tropane alkaloids by strain nr 1, t°=28

Ilość dni inkubacji Incubation, days	Zawartość alkaloidu w pożywce w miligramach Concentration of alkaloids in the medium, mg			
	atropina	l-hyoscyjamina	skopolamina	homatropina
0	4,500	4,250	4,300	4,375
2	2,150	2,100	1,975	2,575
4	1,175	1,025	0,950	1,625
6	0,150	0,175	0,00	0,950

Tabela II

Wpływ temperatury na szybkość rozkładu atropiny przez szczep *Arthrobacter atropini*. *pH* = 5,3

Effect of temperature on the rate of decomposition of atropine by strain of *Arthrobacter atropini*. *pH* = 5,3

Ilość dni inkubacji Incubation days	Zawartość atropiny w pożywce w miligramach Concentration of atropine, mg				
	18°	24°	28°	33°	38°
0	4,375	4,375	4,375	4,375	4,375
2	3,150	3,100	2,450	2,800	3,600
3	2,900	2,900	1,775	2,600	3,350
4	2,700	1,975	1,375	2,300	3,300
5	2,375	0,800	0,700	1,900	3,225
6	1,450	0,350	0,112	1,400	—

Tabela III

Wpływ *pH* na szybkość rozkładu atropiny przez *Arthrobacter atropini* w temperaturze 28°

Effect of *pH* on the rate of decomposition of atropine by *Arthrobacter atropini* at temperature 28°

Ilość dni inkubacji Incubation, days	Zawartość atropiny w pożywce w miligramach Concentration of atropine, mg				
	pH 4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
0	4,375	4,375	4,375	4,375	4,375
2	3,375	2,875	2,450	3,900	2,800
3	2,175	1,900	1,775	3,650	2,025
4	1,400	0,975	1,375	3,250	1,550
5	1,175	0,500	0,700	2,800	1,225
6	0,975	0,100	0,112	2,600	1,000

Zawartość alkaloidów w pożywkach oznaczano metodą Reifera i Buchowicza (1955).

Spadek zawartości alkaloidu przy *pH* 8,0 nie jest wynikiem działania bakterii, gdyż pożywka w czasie inkubacji nieznacznie tylko zmętniała. Autorzy sądzą, że jest on spowodowany hydrolizą alkaloidu pod wpływem nadmiaru jonów wodorotlenowych, co jest zgodne z obserwacjami Zwirblisa i innych (1956).

Wreszcie bilans azotowy wykazał, że w ciągu 12 dni od daty zaszczepienia nie wydziela się z roztworu żaden związek lotny, zawierający azot w cząsteczce. Wyniki bilansu azotowego przytoczono w tabeli IV.

Tabela IV

Zawartość azotu w pożywkach oraz przyrost azotu bakteryjnego w miligramach

Nitrogen content of the medium and the increase of bacterial nitrogen, mg

Ilość dni inkubacji Incubation, days	Pożywka — Medium		Azot bakteryjny Bacterial nitrogen: b—a
	Odwirowana (a) supernatant	nieodwirowana (b)-total	
0	361,9		
4	327,5	350,0	22,5
5	317,5	366,5	49,0
6	294,5	369,0	73,5
8	285,0	363,0	78,0
10	276,5	359,0	82,5
12	272,0	358,5	86,5

Ilość azotu ogólnego oznaczano zmodyfikowaną metodą Kjeldahla wg Zinnekego (1952) przy zastosowaniu katalizatora o składzie: 5 g sacharozy, 2 g HgO, 25 g K_2SO_4, 1 g selenu w ilości 500 mg na próbę.

b. Szczep nr 2

Wygląd mikroskopowy: początkowo bardzo ruchliwe, lekko owalne komórki o urzęsieniu monotrichalnym (ruchliwość żmijkowata) układające się w tratwy. Ruchliwość stwierdzono na wszystkich pożywkach, na których bakterie wykazywały wzrost. Wymiary: 0,6×0,8 μ. Po kilku dniach całkowicie zatracają zdolność ruchu.

Wygląd kolonii na agarze: kolonie nieregularne (amebowate), błyszczące, o brzegach rozlewających się, strukturze ziarnistej, konsystencji śluzowatej i barwie białawej. Wymiary kolonii po 3 dobach wahały się od 3 do 7 mm.

Skos agarowy z atropiną: po 2 dniach silny wzrost wzdłuż rysy, biały, błyszczący, rozlewający się, o powierzchni gładkiej, błyszczącej, linii brzegowej gładkiej i konsystencji śluzowatej. Po 4 dniach cała powierzchnia skosu pokryta śluzowatym nalotem bakterii.

Skos agarowy z glikozą: wzrost jeszcze szybszy niż na skosie z atropiną, poza tym analogicznie jak wyżej.

Żelatyna kłuta: w ciągu 12 dni wzrostu nie stwierdzono.

Ziemniak: silny wzrost wzdłuż rysy, o barwie białej, powierzchni gładkiej, błyszczącej, linii brzegowej pofałdowanej i konsystencji śluzowatej. Po 10 dniach cała powierzchnia ziemniaka pokryta grubym kożuchem, oraz lekkie zbrunatnienie podłoża.

Marchew: po 3 dniach rozlewający się po całej powierzchni wzrost o barwie jasnobeżowej, powierzchni gładkiej, błyszczącej i konsystencji śluzowatej.

Woda peptonowa: w ciągu 12 dni wzrostu nie stwierdzono.

Pożywka syntetyczna: po 2 dniach jednolite słabe zmętnienie, po 4 dniach silne zmętnienie z wypadającym kłaczkowatym osadem.

Mleko z lakmusem: po 9 dniach odbarwienie lakmusu, pojawił się kożuszek na powierzchni mleka; skrzepu i hydrolizy nie stwierdzono.

Białko: po 2 dniach wzrost wzdłuż rysy o barwie białej, powierzchni gładkiej, błyszczącej, o brzegach gładkich i konsystencji śluzowatej. Białko nie uległo hydrolizie. Po 4 dniach obserwuje się silny wzrost od powierzchni w górę (charakter brodawkowy) i pofałdowanie linii brzegowej. Osadu w wodzie kondensacyjnej nie stwierdzono.

Opisany szczep jest gramujemny; wykazuje słaby wzrost na pożywce azotanowej i na peptonie (nie wytwarza siarkowodoru). Na pożywkach peptonowych z cukrami rozwija się bardzo dobrze (glikoza, sacharoza, laktoza), również dobrze z mannitolem, nieco gorzej na glicerolu. Na pożywkach z cukrami bez peptonu rozwija się znacznie słabiej. Hydrolizy skrobi nie stwierdzono, spor nie wytwarza.

Optimum temperatury wzrostu około 26° optimum *pH* — 6,0.

Opisany szczep, podobnie jak i poprzedni, rozkłada alkaloidy tropanowe, jednak szybkość rozkładu jest kilkakrotnie mniejsza niż u szczepu nr 1. Jako nieprzydatny do dalszych badań (Kączkowski 1959), nie został przebadany tak szczegółowo jak szczep nr 1.

WYNIKI I DYSKUSJA

Szczepy opisane w niniejszej pracy nie wykazują podobieństwa do opisanych w literaturze bakterii rozkładających alkaloidy tropanowe (Łypacewicz 1930, Możejko 1952, Tomerska 1952, Küster 1952).

Szczep nr 1 należy zaliczyć do rodzaju *Arthrobacter* (Bergey 1957). Wykazuje on znaczne podobieństwo do szczepu *Arthrobacter terregens*, opisanego przez Lochheada i Burtona (1953). Podobnie jak *A. terregens*, szczep nasz, wyizolowany również z gleby, ma te same wymiary, wykazuje znaczny pleomorfizm, komórki są nieregularne i zakrzywione, wykazują formy kokoidalne i układają się w kształcie litery V. *A. terregens* wymaga bliżej nie zidentyfikowanego czynnika glebowego (terregens factor — *Tf*), z czym wydaje się być zgodne zaobserwowane przez autorów niniejszej pracy stopniowe zanikanie aktywności rozwojowej szczepu nr 1 w ciągu około 12 miesięcy od momentu wyizolowania go z gleby.

W stosunku do *Arthrobacter terregens* szczep nr 1 wykazuje następujące różnice: szczep ten jest gramdodatni, podczas gdy *A. terregens* jest gramujemny lub zmienny, nie rozwija się na żelatynie, a dobrze rozwija się na ziemniaku.

Dla szczepu nr 1 proponuje się nazwę *Arthrobacter atropini*.

Szczep nr 2 wg klucza Bergeya (1957) należy zaliczyć do rodzaju *Pseudomonas*, różni się jednak bardzo znacznie od opisanych bakterii. Brak bardziej szczegółowej charakterystyki szczepu nr 2 wynika z jego nieprzydatności w badaniach nad rozkładem alkaloidów tropanowych (Kączkowski 1959).

Ze względu na łatwość, z jaką udało się wyizolować opisane szczepy z pierwszej próbki gleby, wydaje się, że bakterie te występują dość powszechnie. Działalność opisanych bakterii, polegająca na rozkładaniu substancji toksycznych dla roślin, jakimi są alkaloidy, wydaje się potwierdzać tezę Bucherera (1942) o doniosłym znaczeniu bakterii w unieczynnianiu „trucizn".

LITERATURA

Bergey's Manual of determinative bacteriology. VII Ed. Bailiere, Tyndal and Cox., Ltd. London, 1957.

Bucherer H., 1942: Über den mikrobiellen Abbau von Giftstoffen. Mitt. II. *Zentr. Bakter.*, **105**: 445.

Frankenburg W. G., 1955: Nicotine degradation *in vitro* induced by agents from tobacco seeds. *Nature*, **175**: 945.

Frankenburg W. G., Vaitekunas A. A., 1955: Chemical studies on nicotine degradation by microorganisms derived from the surface of tobacco seeds. *Arch. Biochim. Biophys.*, **58**: 509.

Kączkowski J., 1959: Mikrobiologiczny rozkład alkaloidów tropanowych. *Acta Soc. Botan. Polon.* (w druku).

Küster E., 1952: Abbau heterocyklischer N- Verbindungen durch verschiedene Bodenmikroorganismen. *Zentr. Bakter., I. O.*, **158**: 350.

Lochhead., Burton., 1953: *Canad J. Botany L. C.*, wg Bergeys Mannual of determinative bacteriology VII Ed. London, 1957.

Łypacewicz J., 1930: Rozkład alkaloidów przez bakterie. *Acta Soc. Botan. Polon.*, **7**: 553.

Możejko M., 1952: Rozkład alkaloidów przez mikroorganizmy glebowe. Praca magisterska (Zakł. Fizjologii Roślin UW), maszynopis.

Możejko-Toczko M., 1960: Rozkład lupaniny przez *Pseudomonas lupanini*. *Acta Microbiol. Polon.* **9**: 157.

Reifer I., Buchowicz J., 1955: Mikrometoda oznaczania alkaloidów tropanowych w materiale roślinnym. *Acta Biochim. Polon.*, **2**: 187.

Reifer I., Tarnowska K., 1950: Mikro-jodometryczne oznaczanie azotu w materiale roślinnym. *Acta Soc. Botan. Polon.*, **20**: 739.

Tomerska H., 1952: Rozkład alkaloidów przez mikroorganizmy glebowe. Praca magisterska (Zakład Fizjologii Roślin UW), maszynopis.

Wada E., Yamasaki K., 1954: Degradation of nicotine by soil bacteria. *J. Amer. Chem. Soc.* **76**: 155.

Wada E., 1956: Microbial degradation of nornicotine. *Arch. Biochim. Biophys.*, **64**: 244.

Wada E., 1957: Microbial degradation of the tobacco alkaloids and some related compounds. *Arch. Biochim. Biophys.*, **72**: 145.

Zinneke F., 1952: Die Ausgestaltung der Kjeldahl Verfahrens zu einer allgemein anwendbaren Stickstoff-Bestimmungsmethode. *Angew. Chemie*, **64**: 220
Zwirblis P., Socholitzky I., Kondritzer A. A., 1956: The kinetics of the hydrolisis of atropine. *J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **45**: 450.

J. Kączkowski and *M. Możejko-Toczko*

BACTERIA DECOMPOSING TROPANE ALKALOIDS

Summary

Two new bacterial strains were isolated from soil and described. Both strains are able to use tropane alkaloids as the only source of carbon and nitrogen.

Nr 1 of the isolated strains was proved to be more active then the second one. It decomposed this alkaloid to tropine and tropic acid.

Strain nr 1 has many characteristics of *Arthrobacter terregens*. Owing to the fact that it decomposes atropine, the name of *Arthrobacter atropini* has been proposed.

Strain nr 2 has not been extensively studied. It belongs to the genus *Pseudomonas*.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 181—189

T. Wróbel

WPŁYW LIOFILIZACJI SZCZEPÓW *RHIZOBIUM* NA AKTYWNOŚĆ ICH WSPÓŁŻYCIA Z ROŚLINAMI

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach

Wpłynęło dnia 2 sierpnia 1959 r.

Przechowywanie bakterii w stanie zliofilizowanym jest znane już od dawna i z powodzeniem stosowane. Według licznych badaczy (Proom i Hammons 1949, Wisłocki 1953), wiele gatunków bakterii nie zmienia swoich właściwości pod wpływem omawianego zabiegu. Oprócz zaoszczędzenia pracy i pożywek potrzebnych przy częstym przeszczepianiu kolekcji bakterii unika się przez liofilizację zdarzającej się dość często degeneracji hodowli na agarze.

O ile nam wiadomo, metoda liofilizacji jest szerzej stosowana w mikrobiologii lekarskiej i przemysłowej.

W dziedzinie interesujących nas bakterii symbiotycznych roślin motylkowych Appelman i Sears (1946) stwierdzili, że szczepy *Rhizobium leguminosarum* przechowywane w stanie zliofilizowanym nie traciły zdolności współżycia z roślinami motylkowymi nawet po 2-4 latach. Dotychczas jednak metoda liofilizacji nie znalazła szerszego zastosowania w przechowalnictwie szczepów *Rhizobium* (Pelczar i współpracownicy 1957).

BADANIA WŁASNE

Celem niniejszej pracy była próba zastosowania metody liofilizacji do przechowywania szczepów *Rhizobium*.

W związku z tym porównano wpływ różnych podłoży (substancji ochronnych przy liofilizacji) na zachowanie właściwości tej bakterii, oraz zbadano wpływ czasu przechowu (1-3 lat) kilku szczepów *Rhizobium* w stanie zliofilizowanym na ich zdolność współżycia z roślinami.

Do badań tych wybrano 5 szczepów *Rh. lupini* i 1 szczep *Rh. meliloti*. W szczególności zostały użyte następujące szczepy z kolekcji puławskiej:

1. *Rh. lupini* — *Cz* wyodrębniony w 1937 r. z łubinu trwałego, odznaczający się dużą aktywnością pod względem wiązania wolnego azotu w symbiozie z łubinami
2. *Rh. lupini* — szczep nr *271*, wyodrębniony z łubinu żółtego słodkiego w 1951 r., uznany za nieco mniej aktywny.
3. *Rh. lupini* — szczep nr *4*, wyodrębniony z seradeli w r. 1938.
4. *Rh. lupini* — szczep nr *5* — z seradeli w 1938 r.
5. *Rh. lupini* — szczep *S* — z seradeli w 1952 r.

Wszystkie szczepy pochodzące z brodawek seradeli uznano za aktywne we współżyciu z tą rośliną.

6. *Rh. meliloti* — szczep *Th* pochodzenia duńskiego, wyodrębniony z lucerny, od wielu lat aktywny w symbiozie z tą rośliną.

Próby liofilizacji wszystkich wymienionych szczepów *Rh. lupini* zostały przeprowadzone dzięki uczynności Kolegów z Instytutu Weterynarii w Puławach — latem 1955 r. Zabieg ten został wykonany na aparacie produkcji angielskiej, przy czym, jako substancji ochronnej użyto surowicy króliczej, powszechnie stosowanej do tego celu w mikrobiologii lekarskiej.

W ciągu lat 1955-1958 przeprowadzono próby regeneracji *Rhizobium* z liofilizatów, w pierwszym i drugim roku co 3 miesiące, następnie co 1/2 roku, stosując do tego celu zwykle używaną dla *Rhizobium* pożywkę agarową. Po 2-3 pasażach przez taką pożywkę szczepy te powracały do normalnego wzrostu.

Następnym etapem było sprawdzenie zdolności wiązania azotu przez szczepy *Rhizobium* po różnym okresie ich przechowu w stanie zliofilizowanym.

Wykonano w tym celu doświadczenia wazonowe, w których porównano zdolność wiązania wolnego azotu przez szczepy *Cz* i nr *271* podczas ich współżycia z łubinem, oraz szczepów nr *4*, nr *5* i *S* w czasie ich symbiozy z seradelą.

W okresie 1-2 miesięcy przed przystąpieniem do doświadczeń wazonowych zliofilizowane szczepy *Rh. lupini* regenerowano na pożywce agarowej z glikozą, pasażując je na niej dwa do trzech razy.

OPIS DOŚWIADCZEŃ WAZONOWYCH Z ŁUBINEM I SERADELĄ

Doświadczenia te wykonano w wazonach zawierających po 10 kg czystego, uprzednio wyprażonego piasku. Do wazonów dodawano zwykle stosowane dla tych roślin pełne nawożenie mineralne z wyjątkiem azotu. Ten ostatni składnik podawano roślinom w okresie poprzedzającym głód azotowy, w ilości 20 mg N w azotanie amonowym na jeden wazon. *pH* piasku w wazonach wynosiło około 6,5

W czasie wzrostu roślin utrzymywano w wazonach stałą wilgotność, przez podlewanie ich wodą destylowaną, początkowo do 40%, następnie do 50% całkowitej pojemności wodnej piasku.

Nasiona łubinu żółtego i seradeli wyjaławiano powierzchniowo przy pomocy 0,1% $HgCl_2$ i 96% alkoholu etylowego, następnie po dokładnym ich przemyciu w wodzie sterylnej zakażano je świeżo przygotowanymi szczepionkami *Rhizobium*.

W doświadczeniach z łubinem do każdego wazonu dawano po 10 jego nasion, a do wazonów przygotowanych dla seradeli po 0,2 g jej nasion. Po wschodach roślin pozostawiono w wazonach po 4 rośliny łubinu i po 20 roślin seradeli.

Siewu dokonywano w początkach maja. Zbiór roślin następował podczas pełni kwitnienia (1956, 1958) lub podczas zawiązywania strąków (1957 r.).

Doświadczenia te prowadzono w ciągu 3 lat (1956-1958), przy czym stosowano zawsze po 4 równoległe powtórzenia.

Kombinacje doświadczalne były w ciągu tych lat następujące:

I. Doświadczenia z łubinem

1. Kontrola — rośliny zakażone szczepem *Cz Rh. lupini* hodowanym stale na pożywce agarowej.
2. Rośliny zakażone szczepem *Cz* uprzednio liofilizowanym.
3. Kontrola — rośliny zakażone szczepem nr *271 Rh. lupini* nie liofilizowanym, hodowanym jak szczep *Cz*.
4. Rośliny zakażone szczepem nr *271* uprzednio liofilizowanym.

II. Doświadczenia z seradelą

5. Kontrola — rośliny zaszczepione szczepem nr *4 Rh. lupini*, hodowanym stale na pożywce agarowej.
6. Rośliny zaszczepione szczepem nr *4* liofilizowanym.
7. Kontrola — rośliny zaszczepione szczepem nr *5 Rh. lupini*, hodowanym tak samo jak kontrolny szczep nr *4*.
8. Rośliny zaszczepione szczepem nr *5* liofilizowanym.
9. Kontrola — rośliny zaszczepione szczepem *S Rh. lupini*, hodowanym jak szczepy nr nr *4* i *5* w kombinacji 5 i 7.
10. Rośliny zaszczepione szczepem *S* liofilizowanym.

W 1956 r. użyto jako materiału szczepionkowego w seriach 2, 4, 6, 8 i 10 szczepy przechowywane w stanie zliofilizowanym w ciągu jednego roku. W 1957 roku do takich samych serii zastosowano szczepy po 2 latach i w 1958 r. — po 3 latach przechowu w tym stanie.

W sumie doświadczenie to składało się więc z 10 kombinacji powtarzanych w ciągu 3 lat ze szczepami coraz to dłużej przechowywanymi w stanie zliofilizowanym. Oddziaływanie ich na rośliny porównywano z działaniem tych samych szczepów przechowywanych stale na pożywkach agarowych z glikozą.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

BRODAWKOWANIE ROŚLIN

Łubin — Obserwacji brodawkowania dokonywano na korzeniach dwukrotnie: w czasie wyrównywania ilości roślin w wazonach, tj. po upływie 3-4 tygodni od wzejścia roślin (początki symbiozy), oraz przy sprzęcie roślin. Łubiny zakażone obu szczepami nie liofilizowanymi (*Cz*, *271*) tworzyły normalne wykształcone brodawki na korzeniu głównym.

podczas gdy rośliny zakażone tymi samymi szczepami, ale przechowywanymi przez okres 1 i 2 lat w stanie zliofilizowanym, miały brodawki nieco mniejsze i mniej prawidłowo rozmieszczone. Zwłaszcza w serii zakażonej liofilizowanym szczepem nr *271* zaznaczał się wyraźnie opóźniony rozwój brodawek. Także u wielu roślin tej serii brodawki tworzyły się na korzeniach bocznych.

Różnice w brodawkowaniu nie były już tak wyraźne przy sprzęcie roślin dokonywanym w pełni kwitnienia (1956 i 1958) lub początkach tworzenia się strąków (1957). Jednak i w tym wypadku, szczególnie w serii zaszczepionej liofilizowanym szczepem nr *271* brodawki były mniej prawidłowo wykształcone i rozmieszczone. Jakkolwiek nie zebrano ściślejszych danych, obserwacje te wskazywały na nieco osłabioną wirulencję szczepów po zabiegu liofilizowania.

S e r a d e l a — W wypadku tej rośliny nie stwierdzono wyraźnych różnic w brodawkowaniu roślin; zarówno szczepy przechowywane na pożywkach agarowych jak w stanie zliofilizowanym powodowały wytwarzanie na korzeniach roślin jednego typu brodawek, które były zawsze rozmieszczone przeważnie na korzeniu głównym.

OBSERWACJE NAD ROZWOJEM ROŚLIN

Ł u b i n — We wszystkich doświadczeniach w latach 1956-1958 rośliny zaszczepione liofilizowanymi szczepami *Cz* i nr *271* były początkowo słabsze niż przy użyciu szczepionek kontrolnych. Różnice te jednak stopniowo się zacierały i w czasie kwitnienia już ich nie stwierdzano (patrz fot. 1).

S e r a d e l a — Szczególnie w seriach zaszczepionych liofilizowanymi szczepami *Rhizobium* nr 5 i *S* rośliny były w początkowym stadium wzrostu nieco słabsze od kontrolnych. W czasie kwitnienia wzrost roślin był wszędzie dość wyrównany.

PLANOWANIE ROŚLIN

Wyniki 3-letnich doświadczeń wazonowych z łubinem i seradelą zebrano w tabeli 1.

Z tabeli tej wynika, że oba przechowywane w stanie zliofilizowanym szczepy dla łubinu (*Cz* i *271*) nie oddziaływały w naszym doświadczeniu w sposób zdecydowanie gorszy na plony tych roślin i na zawartość w nich azotu niż te same szczepy nie liofilizowane. Przy tym nawet w 1 z sześciu przeprowadzonych doświadczeń, mianowicie w serii ze szczepem nr *271* użytym po 2 latach przechowu w stanie liofilizowanym, szczep ten wpływał jak gdyby korzystniej, dając lepszy plon roślin i wyższą w nim zawartość azotu, niż ten sam szczep użyty jako kontrola (nie liofilizowany).

Tabela I

Wpływ okresu przechowywania szczepów *Rh. lupini* w stanie zliofilizowanym na ich oddziaływanie na rośliny
Influence of the storage duration of lyophiled cultures of *Rh. lupini* strains on their symbiatical activity
Wyniki doświadczeń wazonowych z łubinem i seradelą
Pot experiments with yellow lupine and serradilla

Roślina doświadczalna Kind of plants	Szczepy *Rhizobium lupini* Strains of *Rhizobium lupini* used for inoculation	Doświadczenia wegetacyjne w 1956 roku Pot experiments in 1956				Doświadczenia wegetacyjne w 1957 roku Pot experiments in 1957				Doświadczenia wegetacyjne w 1958 r. Pot experiments in 1958	
		Średni plon p. s. pędów w g na wazon Mean yield of tops in g per pot		Średni plon N ogóln. w pędach mg/wazon Mean N — content mg per pot		Średni plon p. s. pędów w g na wazon Mean yield of tops in g per pot		Średni plon N ogóln. w pędach mg/wazon Mean N — content mg per pot		Średni plon p. s. pędów w g na wazon Mean yield of tops in g per pot	
		Szczepionka nie liofilizowana Inoculum not lyophiled	Szczepionka liofilizowana po 1 roku przechowu Inoculum after one year of lyophile storage	Szczepionka nie liofilizowana Inoculum not lyophiled	Szczepionka liofilizowana po 1 roku przechowu Inoculum after one year of lyophile storage	Szczepionka nie liofilizowana Inoculum not lyophiled	Szczepionka liofilizowana po 2 latach przechowu Inoculum after 2 years of lyophile storage	Szczepionka nie liofilizowana Inoculum not lyophiled	Szczepionka liofilizowana po 2 latach przechowu Inoculum after 2 years of lyophile storage	Szczepionka nie liofizowana Inoculum not lyophiled	Szczepionka liofilizowana po 3 latach przechowu Inoculum after 3 years of lyophile storage
Łubin żółty *Lupinus luteus* —	Cz	30,8±0,9	31,5±1.08	1092	1075	28,0±1,12	25,9±0,37	868	845	19,0±0,45	20,4±0,64
	nr *271*	26,0±1,82	24,0±1,15	839	799	23,2±1,32	26,1±0,5	702	896	19,0±0,57	18,9±0,22
Seradela *Ornithopus sativum* —	nr *4*	16,8±0,23	16,0±0,22	497	425	12,4±0,31	16,3±0,36	320	320	11,5±0,36	12,5±0,61
	nr *5*	16,7±0.73	11,2±0,90	442	284	10,2±0,17	14,1±0,8	240	360	11,4±0.51	10,1±0,08
	S	16,9±1,15	13,4±0,95	437	353	14,5±0,95	13.9±0,09	364	355		

W doświadczeniach z seradelą wnioskowanie o wpływie liofilizowania *Rh. lupini* dla seradeli na jego zdolności symbiotyczne dla tej rośliny — jest bardziej kłopotliwe. Na przykład po 1 roku przechowu wszystkie szczepy liofilizowane, zwłaszcza nr 5 i *S*, dawały w efekcie symbiozy mniejszy plon roślin i azotu ogólnego niż szczepy kontrolne. Po 2 latach przechowu sytuacja była na ogół odwrotna (szczepy nr *4* i 5), a po 3 latach przechowywania nie było wyraźnych różnic w plonach roślin zaszczepionych szczepami (nr *4* i 5) liofilizowanymi i kontrolnymi.

Jedynym więc wnioskiem nasuwającym się z wyników tych doświadczeń byłoby to, że przechowywanie szczepów w stanie zliofilizowanym w ciągu 1, 2 i 3 lat może mieć różny wpływ na ich wirulencję i aktywność symbiotyczną.

Dla ostatecznego wyjaśnienia, czy liofilizacja może być stosowana z powodzeniem do przechowu szczepów *Rhizobium*, należałoby przeprowadzić znacznie większą liczbę doświadczeń z różnymi przedstawicielami tej grupy bakterii.

Fot. 1. Porównanie rozwoju łubinu żółtego szczepionego *Rh. lupini* nieliofilizowanym i liofilizowanym

Phot 1. Comparison of the growth of yellow lupine inoculated with *Rhizobium lupini* kept either as fresh culture or lyophiled

Objaśnienia: nr 163 — rośliny zaszczepione *Rh. lupini Cz* nie liofilizowanym: nr 167 — rośliny zaszczepione tym samym szczepem po 3 latach przechowywania w stanie zliofilizowanym

Remarks: Phot. 1 — Growth of yellow lupine inoculated with a strain of *Rh. lupini* not lyophiled (pot no. 163) and with the same strain after 3 years of lyophile storage (pot no. 167)

Fot. 2 i 3. Wpływ zastosowania różnych podłoży przy liofilizacji na aktywność *Rh. meliloti* we współżyciu z lucerną. Doświadczenia wazonowe w 1958 r. (okres wzrostu roślin; 15. V — 21. VII.)

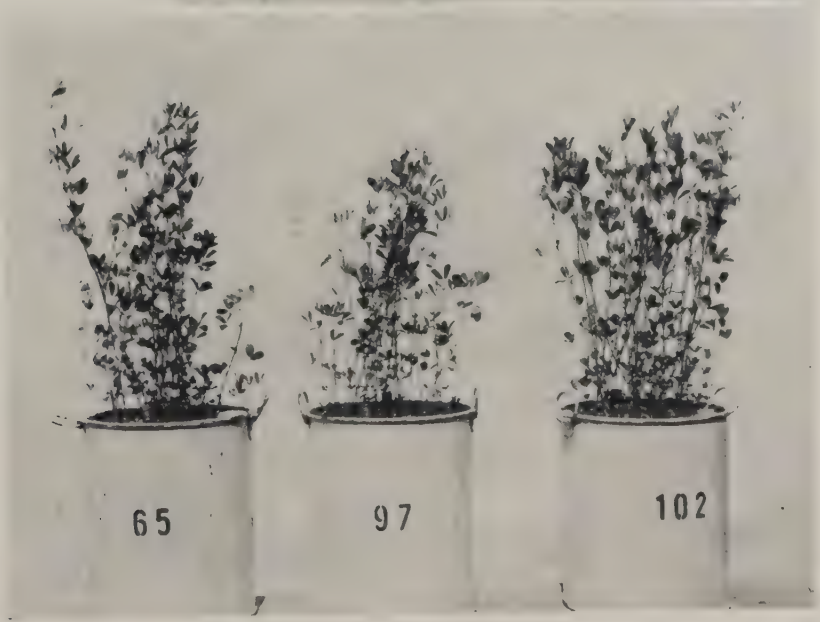
Phot. 2 and 3. Influence of different media applied in lyophilization of *Rh. meliloti* on its symbiotical activity in lucerne. Pot experiments in 1958 (growth of plants from 15 May till 21 July)

Objaśnienia: w wazonie nr 65 — rośliny zaszczepione szczepem *Th Rh. meliloti* hodowanym stale na pożywce agarowej; — nr 90 — rośliny zaszczepione tym samym szczepem liofilizowanym na 10-procentowym roztworze sacharozy z 1% żelatyny; — nr 94 — rośliny zaszczepione tym samym szczepem liofilizowanym na 5-procentowym roztworze mannitolu z 1% żelatyny: — nr 97 — rośliny zaszczepione szczepem *Th Rh. meliloti* liofilizowanym na 5-procentowym roztworze glikozy z 1% żelatyny; w nr 102 — rośliny zaszczepione tym samym szczepem liofilizowanym na surowicy króliczej

Remarks: no. 65 — plants inoculated with *Rh. meliloti* strain *Th* not lyophiled; no. 90 — inoculated with the same strain of *Rh. meliloti* after its lyophilization in 10 p. c. saccharose + 1 p. c. of gelatine; no. 94 — inoculated with the same strain after its liophilization in 5 p.c. mannitol + p.c. gelatine; — no. 97 — inoculated with the same strain of *Rh. meliloti* lyophiled on 5 p.c. of glucose + 1 p.c. gelatine; no. 102 — the same strain after lyophilization on rabbit-serum

Fot. 1

Fot. 2



Fot. 3

WSTĘPNE DOŚWIADCZENIE NAD PRZYDATNOŚCIĄ RÓŻNYCH PODŁOŻY DO LIOFILIZACJI *RHIZOBIUM*

Doświadczenie to przeprowadzano tylko jednorazowo (w 1958 r.). Użyto do niego 1 szczepu *Rh. meliloti* dla lucerny (*Th*). Szczep ten był zliofilizowany w 1957 r. w Zakładzie Mikrobiologii IUNG na czterech następujących podłożach:

Nr 1 — 10-procentowy roztwór wodny sacharozy + 1% żelatyny
Nr 2 — 5-procentowy roztwór wodny mannitolu + 1% żelatyny
Nr 3 — 10-procentowy roztwór wodny glikozy + 1% żelatyny
Nr 4 — Surowica królicza.

Po pierwszym roku przechowu w stanie tak zliofilizowanym bakterie zregenerowano na pożywce agarowej, po czym założono przy użyciu ich jako szczepionek, doświadczenie wegetacyjne z lucerną. Kombinacją kontrolną były rośliny zakażone tym samym szczepem nie zliofilizowanym.

Warunki założenia i przeprowadzenia doświadczenia były analogiczne do wykonanych z łubinem i seradelą. Ilość powtórzeń w każdej serii wynosiła po 4 wazony. Sprzęt roślin nastąpił podczas kwitnienia.

Fotografie 2 i 3 oraz tabela II ilustrują wpływ rodzaju użytego do liofilizacji podłoża na oddziaływanie szczepionki *Rhizobium* na rozwój

Tabela II

Wpływ liofilizowania *Rh. meliloti* (szczep *Th*) na różnych podłożach na aktywność jego współżycia z lucerną. Doświadczenie wazonowe w 1958 r.

Influence of lyophilization of *Rh. meliloti* on different media on its symbiotical activity. Pot experiment in the year 1958.

Lp. serii doświadczeń Series	Rodzaj podłoża przy liofilizacji Kind of medium used for lyophilization	Średni plon p. s. masy pędów g/wazon Mean yield of tops g (per pot)
1.	Kontrola — szczep nie liofilizowany	6,1 ± 0,22
2.	Zliofilizowany sacharoza na podłożu: + żelatyna (nr *1*)	7,7 ± 1,01
3.	„ „ mannitol + żelatyna (nr *2*)	8,5 ± 0,56
4.	„ „ glikoza + żelatyna (nr *3*)	5,6 ± 1,11
5.	„ „ surowica królicza + rabbit serum (nr *4*)	7,3 ± 0,19

lucerny. Serię kontrolną stanowiły rośliny zaszczepione szczepem *Rhizobium* nieliofilizowanym i hodowanym stale na agarze z glikozą.

Jak widzimy, jakość stosowanego do liofilizacji podłoża nie była obojętna dla aktywności symbiotycznej badanego szczepu *Rhizobium meliloti*. W szczególności 10-procentowy roztwór wodny glikozy z 1% żelatyny wpływał wyraźnie ujemnie zarówno na rozwój jak i na plon roślin nim zaszczepionych (patrz tab. II seria 4 i na fot. 2 nr wazonu 97), podczas gdy szczep ten zliofilizowany na trzech pozostałych podłożach wpływał nawet korzystniej na rozwój roślin niż szczep kontrolny. Doświadczenie to wymagałoby powtórzenia z większą ilością szczepów *Rhizobium* i kombinacji doświadczalnych.

LITERATURA

Appelman M. D., Sears O. R., 1946: Studies on lyophiled cultures. Lyophile storage of cultures of *Rh. leguminosarum*. *J. Bact.*, **52**: 209.

Pelczar M. J. i współpracownicy, 1957: Manual of Microbiological Methods.

Proom H., Hammons L. M., 1949: The drying and preservation of bacterial cultures. *J. gen. Microbiol.*, **3**: 7.

Wisłocki S., 1953: Liofilizacja. *Acta Microbiol. Polon.*, **2**: 16.

T. Wróbel

INFLUENCE OF THE LYOPHILIZATION OF *RHIZOBIUM* ON ITS SYMBIOTICAL ACTIVITY

Summary

The author has tried to find out, how far the lyophilization of *Rhizobium* may be applied to the conservation of its culture in respect of the preservation of its symbiotical activity.

1. Five strains of *Rhizobium* have been chosen for our trials: strains *Cz* and nr *271* derived from nodules of lupine and strains nr nr *4*, *5* and *S* — from the nodules of serradilla, all of them being considered as active strains. They have been lyophilized on rabbit-serum and kept in that condition during 1, 2 and 3 years.

The degree of their activity after these times of storage has been estimated during 3 years (1956, 1957 and 1958) in pot experiments with *Lupinus luteus* and *Ornithopus sativum* on sand cultures.

For every strain of *Rhizobium* two combinations have been applied:

1. Control plants of lupine and serradilla inoculated with fresh, not lyophiled strains of *Rh. lupini*.

2. The same kinds of plants inoculated with the same strains lyophiled and stored in this condition during either 1, 2 or 3 years.

The phot. 1 and table I show the influence of inoculation of plants applied in these combinations — on their growth, yield and nitrogen content (the last being estimated during their flowering period).

It seems, that even 3 years of storage in lyophiled condition may sometimes not change the symbiotical activity of *Rhizobium lupini*, but the results of the trials from the years 1956 and 1957 have been so varied, that no definite conclusions can be drawn out of them. More trials with various strains of *Rhizobium* ought to be carried out.

2. Another kind of experiment has been done with an active strain of *Rhizobium meliloti* (strain *Th*). The aim of it was to find out, which sort of liquid media used for the suspension of these bacteria is the most suitable for their lyophilization in respect of its influence on their symbiotical activity.

The strains have been lyophiled on the following 4 media:

1. 10 per cent water solution of saccharose with 1 per cent of gelatine,
2. 5 per cent water solution of mannitol with 1 per cent of gelatine,
3. 10 per cent water solution of glucose with 1 per cent of gelatine,
4. Rabbit-serum.

After one year of storage of the lyophiled cultures they have been used in a pot experiment, in which lucerne plants have been inoculated on pure sand medium with *Rh. meliloti* lyophiled as described above. The control plants have been inoculated by the same strain grown always on glucose agar.

The results are shown on phot. 2 and 3 and in table II, in which the evaluation of the yields of the tops of plants is given in all the experimental series.

Both the photographs and the table II show a markedly depressive effect of the use of 10 p. c. of glucose with 1 p. c. of gelatine for the lyophilization — on the symbiotical activity of *Rh. meliloti*. The application of the other media for lyophilization did not influence badly the activity of these bacteria.

However more experiments are still needed in order to find out the best medium for lyophilization of different strains of *Rhizobium*.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 191—197

T. Kłosowska i *K. Pawłowska*

PRÓBY WYJAŚNIENIA BAKTERIOBÓJCZEGO DZIAŁANIA BOROWIN TYPU WYSOKIEGO

Z Pracowni Mikrobiologii Zakładu P. P. „Obsługa Techniczna Uzdrowisk" w Szczawnie-Zdroju i z Zakładu Mikrobiologii Wyższej Szkoły Rolniczej w Lublinie

Wpłynęło dnia 25 kwietnia 1959 r.

W poprzedniej pracy (Kłosowska 1958) wykazano, że borowiny typu wysokiego mają właściwości bakteriobójcze w stosunku do *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli.*

Mimo licznych badań nie zostało dotychczas wyjaśnione, czy bakteriobójcze działanie borowin wynika z ich fizycznych, chemicznych czy też biologicznych właściwości.

Wołkowa (1946) przypuszcza, że czynnik mikrobiologiczny nie odgrywa przy tym ważniejszej roli, gdyż w jej doświadczeniach szlam wysterylizowany działał bakteriobójczo prawie w tym samym stopniu co szlam świeży. Mogłyby więc być czynne metabolity nagromadzone przez drobnoustroje, trudno jest natomiast przypuszczać, by odgrywały rolę stosunki antagonistyczne między rodzimą mikroflorą borowin i bakteriami chorobotwórczymi.

Kuroczkin (1954) podaje, że sterylizacja szlamu z jeziora Tinaki nie tylko nie niszczy jego właściwości bakteriobójczych, lecz jeszcze je zwiększa. Badacz ten stwierdził również, że bakterie wyodrębnione z leczniczego szlamu nie zachowywały się antagonistycznie w stosunku do *S. aureus.*

Jak podaje Benade (1948), torfy wysokie zawierają małe ilości drobnoustrojów. W ich powierzchniowych warstwach znajdują się głównie grzyby oraz nieliczne promieniowce. Torfy niskie mają natomiast więcej bakterii i promieniowców.

Spośród zbadanych borowin polskich (Kłosowska 1958) borowiny o własnościach silnie bakteriobójczych pochodzą właśnie z torfowisk wysokich, borowiny nieaktywne z torfowisk typu niskiego.

Celem naszych badań było znalezienie:

1. Czy borowiny działające bakteriobójczo na *E. coli* i *S. aureus* wykazują też działanie antybakteryjne względem innych bakterii,

2. jaki jest charakter substancji działających antybakteryjnie w borowinach,

3. czy w tych borowinach są obecne drobnoustroje antagonistyczne względem badanych bakterii chorobotwórczych.

Badania przeprowadzono z następującymi borowinami:
Cieplice — złoże na Jakuszcu — próby pobrano 7. X. 1957 r.
Ludzimierz — złoże n. Czarnym Dunajcem — próby pobrano 1. VIII. 1957.
Świeradów — złoże Skalno — próby pobrano 7. X. 1957.
Krynica — złoże Mochnaczka Wyżna — próby pobrano 7. X. 1957.
Ciechocinek — złoże Wołuszewo — próby pobrano 14. X. 1957.

METODY BADAŃ

1. Oznaczenie antybiotycznego działania borowin na różne bakterie

Jako bakterii wzorcowych w opisanej serii doświadczeń użyto: *Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae* i *Corynebacterium hoffmanni.* Sprawdzono też ponownie oddziaływanie wymienionych borowin na *S. aureus* i *E. coli,* nie znajdując zasadniczych różnic między obecnymi i poprzednimi wynikami (Kłosowska 1958). Żywotność bakterii wprowadzonych do borowiny badano metodą płytkową, opisaną w poprzedniej pracy (Kłosowska 1958). Bakteriostatyczne działanie borowin na *P. vulgaris* oznaczano również na płynnym podłożu Singera o następującym składzie:

pepton	20 g
NaCl	5 g
0,2-procentowy roztwór alkoholowy czerwieni krezolowej	10 ml
0,2-procentowy roztwór alkoholowy błękitu bromo-tymolowego	20 ml
20-procentowy wodny roztwór mocznika	40 ml
Woda destylowana	1000 ml

2. Określenie charakteru substancji działających antybakteryjnie w badanych borowinach

---

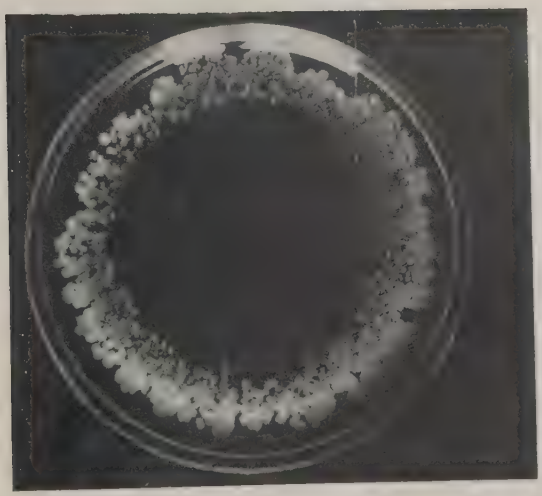
Wpływ borowiny na wzrost bakterii wzorcowych wysianych na powierzchnię agaru po zdjęciu borowiny z płytki

Fot. 1 a, 1 b, 1 c — borowina ze Świeradowa, złoże Skalno
a — *S. aureus* po 24 godzinach hodowli w 37°
b — *S. aureus* po 48 godzinach hodowli w 37°
c — *E. coli* po 24 godzinach hodowli w 37°

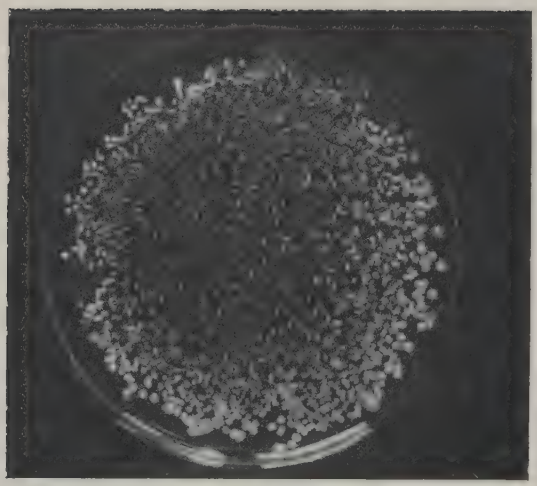
The influence of marsh on test bacteria. The sample of marsh was placed in the centre of the plate for 24 hours, and subsequently the plate was inoculated with bacteria

Phot. 1 a, 1 b, 1 c — marsh from Świeradów
a — *S. aureus* after 24 hours incubation at 37°C
b — *S. aureus* after 48 hours incubation at 37°C
c — *E. coli* after 24 hours incubation at 37°C

Fot. 1a



Fot. 1b



Fot. 1c

Bakteriami wzorcowymi w tej serii doświadczeń były: *S. aureus* i *E. coli*. Charakter bakteriobójczego działania borowin na te organizmy starano się poznać, stosując trzy różne sposoby postępowania:

a) Oznaczanie bezpośrednie: nakładano warstwę borowiny o średnicy 5 cm i wysokości 1 cm na płytki agarowe, których powierzchnię zasiano uprzednio badanymi bakteriami. Hodowlę w 37° rozpoczynano bezpośrednio po nałożeniu borowiny na płytkę lub po 24 godzinach przetrzymywania płytki w temperaturze 10°, umożliwiając w ten sposób dyfundowanie do agaru substancji zawartych w borowinie.

b) Oznaczano działanie substancji dyfundujących do podłoża, układając warstwę borowiny na sterylnej gazie na powierzchni płytki agarowej. Płytki przechowywano w temperaturze około 10°. Po 24 godzinach gazę z borowiną usuwano. Bakterie wzorcowe wsiewano do agaru przed nałożeniem borowiny na płytkę lub też płytkę tę zasiewano badanymi bakteriami po zdjęciu borowiny. Hodowle prowadzono w 37°.

c) Sprawdzono działanie wyciągów borowinowych na wzrost bakterii wzorcowych, przygotowując następujące kombinacje doświadczalne:

c_1 — na płytki wylewano agar odżywczy z zawiesiną bakterii wzorcowych i po jego zastygnięciu nakładano na powierzchnię sterylne krążki bibuły nasycone wyciągiem borowinowym surowym, sterylizowanym lub też wytrząsanym z węglem aktywowanym. Po 24 godzinach hodowli w temperaturze pokojowej zdejmowano krążki bibuły i płytki wstawiano do termostatu (28°);

c_2 — na płytki wylewano sam agar odżywczy i nakładano na jego powierzchnię krążki bibuły nasycone powyższymi wyciągami. Po 24 godzinach usuwano bibułę, a powierzchnię płytki zalewano cienką warstwą agaru z zawiesiną bakterii wzorcowych i wstawiano do termostatu na 24 godziny.

3. Ogólną ilość drobnoustrojów w borowinach oznaczano metodą płytkową.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

1. Oznaczenie bakteriobójczego działania borowin na bakterie.

Wyniki tych badań podano w tabeli I.

Podobnie jak w naszej poprzedniej pracy (Kłosowska 1958) stwierdzono tu silne bakteriobójcze działanie borowin typu wysokiego z Cieplic, Ludzimierza i Świeradowa. Natomiast borowiny typu niskiego, pochodzące z Krynicy i Ciechocinka działały dużo słabiej.

2a. Oznaczając bezpośrednie działanie borowin stwierdzono, że badane bakterie rozwijały się normalnie wokół nałożonej na płytkę borowiny nawet w bezpośrednim jej sąsiedztwie i to niezależnie od tego, czy borowina pochodziła ze złoża typu niskiego czy wysokiego. Na płytkach z borowiną typu niskiego równocześnie z bakteriami wzorcowymi wyrastała mikroflora rodzima, tworząc szczególnie liczne kolonie wokół krążka borowiny.

2b. Badając płytki, na których uprzednio leżała borowina na gazie sterylnej stwierdzono, że miejsca spod borowiny stały się nieprzydatne dla rozwoju bakterii i to zarówno wtedy kiedy je wysiano przed nałożeniem borowiny na płytkę, jak i wtedy gdy wprowadzono je dopiero

po zdjęciu borowiny z płytki (fot. 1a i c). Charakteru tego sposobu działania borowiny bliżej nie określano. Jak wynika z podanych obserwacji, czynnik bakteriobójczy nagromadzał się w podłożu tylko w miejscach bezpośredniego zetknięcia się agaru z borowiną.

Tabela I

Przeżywalność bakterii wzorcowych w borowinach różnego pochodzenia (w dniach)

Survival period (in days) of test bacteria in marshes

Rodzaj borowiny Kind of marsh	Nazwa złoża borowiny Place of sampling	*C. hoffmanni*	*K. pneumoniae*	*Ps. aeruginosa*	*P. vulgaris*
Wysoka High-moor type	Cieplice złoże na Jakuszcu	4	5	6	
„	Ludzimierz złoże n. Czarnym Dunajcem	5	6	8	2
„	Świeradów złoże Skalno	7	7	11	3
Niska Low-moor type	Krynica złoże Mochnaczka Wyżna	13	16	>18	8
„	Ciechocinek złoże Wołuszewo	14	17	>18	10

Dla sprawdzenia, czy antybakteryjny czynnik zawarty w borowinie ma charakter bakteriobójczy czy tylko bakteriostatyczny, w dalszym ciągu doświadczeń hodowlę prowadzono przez 48 godzin. Stwierdzono wówczas (fot. 1b), że na powierzchni agaru, do której przylegała borowina, wyrosły kolonie bakterii testowych. Były one jednak drobne i ilość ich była niewielka w porównaniu z ilością kolonii wyrosłych w miejscach, na które borowina nie działała.

Borowiny wysokie w porównaniu z borowinami niskimi zawierały bardzo mało swoistej mikroflory. Na przykład w doświadczeniach z borowiną ze Świeradowa, na płytkach po zdjęciu z nich masy borowinowej wyrastały tylko wysiane bakterie testowe. Na płytkach z borowiną typu niskiego występował natomiast na całej powierzchni agaru, obok bakterii wzorcowych, bardzo obfity wzrost rodzimej mikroflory. Utrudniało to bardzo odczytywanie wyników.

2c. Wpływ wyciągów z borowin na bakterie wzorcowe. Na powierzchni płytek w miejscach, na które uprzednio nałożono krążki bibuły z wy-

ciągiem borowinowym, można było zauważyć bujniejszy wzrost bakterii wzorcowych niż na pozostałych częściach płytki. Świadczyłoby to o tym, że ciała czynne, o ile są zawarte w borowinach, w większym rozcieńczeniu mogą stymulować rozwój drobnoustrojów. Podobne zjawisko obserwowano przy zastosowaniu zarówno wyciągu surowego jak sterylizowanego w autoklawie lub też wytrząsanego z węglem aktywowanym. Jak wynika z tych doświadczeń, ciała czynne zawarte w borowinie nie ulegały inaktywacji w wysokich temperaturach i nie były sorbowane przez węgiel aktywowany.

3. Oznaczenie ogólnej ilości drobnoustrojów oraz mikroorganizmów antagonistycznych w badanych borowinach. W borowinach z Ludzimierza, Cieplic i Świeradowa wzrost kolonii występował dopiero przy rozcieńczeniu 1 : 100. Obserwowano tu nieliczne drobnoustroje, wśród nich zupełny brak promieniowców. Te same wyniki uzyskano stosując różne pożywki, służące do oznaczania ogólnej liczby bakterii i promieniowców.

Przypuszczano, że przyczynę bakteriobójczego działania borowin mogą stanowić drobnoustroje antagonistyczne zasiedlające borowinę. W wyniku przeprowadzonych badań okazało się jednak, że borowiny odznaczające się silnymi właściwościami bakteriobójczymi nie zawierały wcale drobnoustrojów antagonistycznych. Najbardziej nieoczekiwane wyniki dały doświadczenia z borowiną z Krynicy. Borowina ta działała najsłabiej na bakterie testowe, zawierała też największą liczbę rodzimych drobnoustrojów; ogólna liczba bakterii wynosiła w niej około 700.000, promieniowców około 400.000 komórek na 1 g borowiny. Antagonistów w stosunku do ogólnej liczby drobnoustrojów było zaledwie około 7%. Duża ilość drobnoustrojów w borowinie z Krynicy i znikoma w borowinach z pozostałych złóż potwierdziły wyniki badań B e n a d e' g o (1948). Podaje on, że torfy wysokie zawierają mało drobnoustrojów, torfy niskie natomiast znacznie większe ich ilości. Brak drobnoustrojów antagonistycznych w borowinach o działaniu bakteriobójczym, jak również występowanie ich w borowinie o najmniejszej aktywności — to wszystko wskazywałoby na istnienie jakiegoś innego czynnika bakteriobójczego w borowinach. Byłoby to zgodne z wynikami uzyskanymi też przez K u r o c z k i n a (1954), który stwierdził, że drobnoustroje wyosobnione ze szlamu leczniczego nie wywierały żadnego działania na bakterie chorobotwórcze.

WNIOSKI

1. Badane borowiny oddziaływały z różną mocą na bakterie testowe. W borowinach typu wysokiego — Cieplice, Ludzimierz i Świeradów, okres przeżycia bakterii wzorcowych był kilkakrotnie krótszy aniżeli w borowinach typu niskiego (tab. I).

2. Miejsca na agarze, na których leżała borowina typu wysokiego były nieprzydatne dla wzrostu bakterii wzorcowych i to zarówno dla bakterii dodanych do agaru przed położeniem borowiny, jak dla bakterii wysianych na agar po zdjęciu borowiny (fot. 1a i b). Z obserwacji tych wynika, że czynnik bakteriobójczy nagromadzał się w podłożu tylko w miejscach bezpośredniego zetknięcia agaru z borowiną.

3. Wyciągi borowinowe z wszystkich badanych borowin działały stymulująco na wzrost bakterii wzorcowych. Sterylizacja wyciągów oraz dodatek węgla aktywowanego nie wpływały na nasilenie ich działania. Świadczyłoby to o tym, że czynniki zawarte w borowinie nie ulegały inaktywacji w wysokich temperaturach i nie były adsorbowane przez węgiel aktywowany.

4. W borowinach o własnościach silnie bakteriobójczych było na ogół mało rodzimej mikroflory. W borowinach tych nie stwierdzono występowania drobnoustrojów antagonistycznych. Brak drobnoustrojów antagonistycznych w borowinach o działaniu bakteriobójczym, jak również występowanie ich w borowinach najmniej aktywnych, wskazuje na obecność w nich jakiegoś czynnika bakteriobójczego, nie opartego na antagonizmie bakteryjnym.

Składamy serdeczne podziękowanie prof. drowi J. Gołębiowskiej i drowi A. Jarockiej za cenne rady i wskazówki oraz mgrowi T. Piotrowskiemu za wykonanie zdjęć do niniejsze pracy.

LITERATURA

Benade W., 1948: Mikrobiologie der Moore. *Ztschr. physik. Therapie, Bäder-Klimaheilkunde,* **1**: 85.

Kłosowska T., 1958: Badania nad bakteriobójczym działaniem borowin. *Acta Microbiol. Polon.,* **7**: 45.

Kuroczkin W. I., 1954: Ob antimikrobnych swojstwach lieczebnoj griazi oziera Tinaki. *Trudy Astrachanskowo Med. Inst.,* **2**: 248.

Wołkowa O. J., 1946: Ob mechanizmie diejstwija griazi iz oziera Tambukowskawo. *Mikrobiołogija,* **10**: 319.

T. Kłosowska and *K. Pawłowska*

ATTEMPS OF EXPLAINATION OF BACTERIOSTATIC ACTION OF HIGH-MOOR TYPE MARSHES

Summary

The high-moor type marshes were found to inhibit the growth of test bacteria (Table I). The samples of marsh placed on the surface of nutrient agar plates for 24 hours made the medium in places where it was in direct contact with the marsh unsuitable for growth of bacteria.

This effect was observed, when plates were inoculated with bacterial suspensin, both, before and after placing the marsh samples on medium.

High-moor type marshes contained very small number of endogenous microorganisms. Among them no antagonistic microorganisms were found; on the other hand there were great quantities of microorganisms in low-moor type marshes but the percentage of antagonistic microorganisms in relation to the total number of microorganisms was small.

The extracts of all investigated marshes had no inhibiting influence on test bacteria and even stimulated their development.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9: 199—204

S. Bujak

WPŁYW SZCZEPIENIA OGÓRKÓW BAKTERIAMI FERMENTACJI MLEKOWEJ NA JAKOŚĆ PRODUKTU PO JEGO ZAKISZENIU

Z Katedry Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Lublinie

Wpłynęło dnia 9 maja 1959 r.

Proces kwaszenia ogórków zachodzi pod wpływem własnej rodzimej mikroflory, składającej się z różnych fizjologicznych grup drobnoustrojów. Rozwój tych grup drobnoustrojów w zalewie ogórków uzależniony jest od zawartości w niej tlenu, od jej kwasowości, temperatury, stężenia soli kuchennej oraz innych substancji dodawanych wraz z przyprawami. Proces fermentacji ogórków można podzielić na trzy okresy. W pierwszym okresie, gdy zalewa nasycona jest tlenem, a jej kwasowość jest niska, mogą rozwijać się drobnoustroje wytwarzające enzymy pektolityczne (Nortje i Vaughn 1953, Vaughn, Balatsouras, York i Nagel 1957, Fabian i Allen 1952). Nadmierny rozwój tych drobnoustrojów może być przyczyną powstawania różnych wad kwaszonych ogórków, takich jak wiotczenie, powstawanie pustych komór w miejscu gniazd nasiennych, lub śluzowacenie powierzchni ogórków. Rozwój tych bakterii może również nastąpić po zakończeniu procesu fermentacji, jeżeli stopień ukwaszenia zalewy jest niewystarczający dla ich zahamowania (Vaughn, Levinson, Nagel i Krumperman 1954). W drugim okresie fermentacji rozwijają się bakterie hetero- i homofermentacji mlekowej (Pederson i Albury 1953, Costilow i współpracownicy 1956). W trzeciej fazie pojawiają się w większych ilościach drożdże.

Pederson i Albury (1953) w celu nadania fermentacji ogórków prawidłowego kierunku, już w pierwszych dniach jej trwania szczepili zalewę czystymi hodowlami bakterii fermentacji mlekowej. Badacze ci prowadzili doświadczenia w laboratorium i uzyskali wyniki dodatnie. Costilow i współpracownicy (1956) wykazali jednak, że w warunkach przemysłowych kolejność rozwoju poszczególnych gatunków bakterii

w zalewie jest inna aniżeli w warunkach laboratoryjnych. Zachodziła więc obawa, że szczepienie ogórków bakteriami fermentacji mlekowej przed ich zakiszeniem może pozostać bez wpływu na jakość gotowego produktu.

BADANIA WŁASNE

Celem tej pracy było zbadanie w warunkach przemysłowych wpływu szczepienia ogórków bakteriami fermentacji mlekowej na jakość zakiszonego produktu po dłuższym okresie jego przechowywania.

Do badań użyto ogórków odmiany „Monastyrskiej". Na 100 kg ogórków dodawano następujące ilości przypraw: kopru 2 kg, korzeni chrzanu 0,2 kg, czosnku 0,1 kg, liści chrzanu 0,2 kg i liści dębu 0,2 kg. Ogórki po złożeniu w beczkach szczepiono 100 ml 48-godzinnej hodowli bakterii i zalewano je 6-procentowym roztworem soli kuchennej. Do szczepień użyto bakterii mlekowych w następujących kombinacjach:

1. Kontrola — nie szczepione,
2. Mieszana hodowla *Lactobacillus brevis, L. plantarum* i szczep zbliżony do *Streptococcus lactis,*
3. *Leuconostoc mesenteroides* + mieszana hodowla bakterii mlekowych (jak wyżej),
4. *L. mesenteroides.*

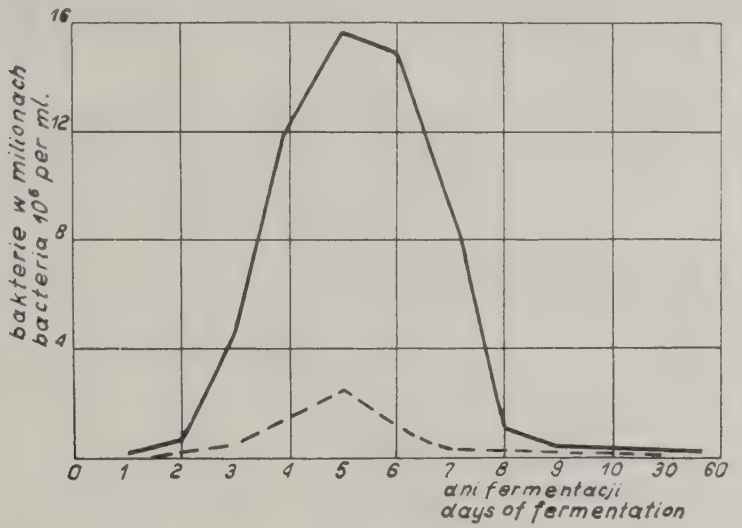
Po zaszczepieniu beczki zamykano szpuntami, zaopatrzonymi w szklane rurki służące do pobierania próbek zalewy podczas fermentacji ogórków. Ogórki w beczkach przechowywano w szopie przez okres około 10 dni dla przeprowadzenia głównej fermentacji. Po tym okresie i po uzupełnieniu zalewy, beczki z ogórkami przenoszono do zbiorników wodnych, w których składowano je przez okres około 3 miesięcy. Następnie ogórki poddawano ocenie organoleptycznej. W szczególności badano następujące cechy: jędrność, smak, barwę ogórków i zalewy oraz odsetek ogórków z pustymi komorami. Ponadto określano kwasowość zalewy oraz zawartość w niej kwasu octowego.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

W latach 1955-1957 w Zakładach Kiszarniczych przeprowadzono 3 serie doświadczeń w beczkach o pojemności 70 kg ogórków (razem 41 beczek).

W pierwszej serii doświadczeń szczepiono ogórki I wyboru mieszaną hodowlą bakterii mlekowych bez *L. mesenteroides.* W zalewie ogórków kontrolnych, nie szczepionych, wyraźny wzrost mikroflory wystąpił dopiero w trzecim dniu fermentacji, a w zalewie ogórków szczepionych w drugim dniu fermentacji. Największa ilość bakterii wystąpiła w piątym dniu fermentacji w obu kombinacjach. W kombinacji nie szczepionej znaleziono 3 miliony bakterii w 1 ml zalewy, a w doświadczalnych około 16 milionów bakterii. Po tym okresie ilość bakterii kwaszących zmniejszała się. Dziesiątego dnia fermentacji znaleziono tylko około 500 bakterii w 1 ml zalewy. W okresie przechowywania ogórków

obserwowano ponowny wzrost ilości bakterii w zalewie, lecz nie stwierdzono wyraźnych różnic w ilościach bakterii pomiędzy ogórkami szczepionymi i nie szczepionymi (rys. 1).



Rys. 1. Ilość bakterii kwaszących w 1 ml zalewy
Fig. 1. Viable count of acidifying bacteria, per 1 ml of the brine
——— ogórki szczepione — inoculated
- - - - - - - - ogórki kontrolne — control

Drożdże występowały w małych ilościach. Po 10 dniach fermentacji znaleziono zaledwie 50-300 komórek w 1 ml zalewy. Po 60 dniach przechowywania ogórków znaleziono 50 000-70 000 komórek drożdży; po 90 dniach ilość drożdży spadła do 120-500 komórek w 1 ml zalewy.

W ogórkach kontrolnych znaleziono około 30% tzw. pustaków, natomiast wśród ogórków szczepionych pustych było tylko około 10%. Ogórki zwiotczałe występowały w podobnych ilościach w obu przypadkach (tab. I). Zalewa ogórków kontrolnych była nieklarowna, koloru szarozielonkawego. Zalewa ogórków szczepionych była przejrzysta o odcieniu zielonkawym. Nie stwierdzono różnic w smaku pomiędzy ogórkami szczepionymi i nie szczepionymi.

Drugą serię doświadczeń przeprowadzono z ogórkami I i II wyboru. Szczepiono je następującymi kombinacjami: 1. mieszaną hodowlą bakterii mlekowych, 2. mieszaną hodowlą + *L. mesenteroides*, 3. *L. mesenteroides* i 4. kontrola (nie szczepione). W kontroli I wyboru znaleziono około 40% pustaków i 15% zwiotczałych, a w II wyborze 70% pusta-

ków i 10% zwiotczałych. Najlepsze wyniki uzyskano w kombinacji szczepionej hodowlą *L. mesenteroides*. Ilość pustaków w tej kombinacji wynosiła jedynie 10% w I wyborze i 27% w II wyborze. Ogórków zwiotczałych było w I wyborze 2%, a w II wyborze 8%. W pozostałych kombinacjach uzyskano gorsze wyniki, znacznie lepsze jednak niż w kontroli (tab. I).

Tabela I

Jakość kiszonych ogórków po 3,5-miesięcznym przechowywaniu
Quality of fermenting cucumbers after 3,5 months of their preservation

Seria i rok Serie and year	Szczepiono bakteriami Bacteria used as starter	Jędrne Hard %			Zwiotczałe Soft %			Puste Bloaters %			Rozpadające się Desintegrated %		
		wybór — sort											
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
I 1955	Bez szczepienia, kontrola No inoculation, control	55	—	—	17	—	—	28	—	—	0	—	—
	Mieszana hodowla bakterii mlekowych Mixed culture of *Lactobacilli* and *S. lactis*	78	—	—	13	—	—	9	—	—	0	—	—
II 1956	Kontrola Control	48	19	—	15	10	—	37	68	—	0	3	—
	L. mesenteroides	88	64	—	2	8	—	10	27	—	0	0	—
	L. mesenteroides + mieszana hodowla bakterii fermentacji mlekowej *L. mesenteroides* + lactic acid bacteria	75	39	—	6	12	—	19	48	—	0	0	—
	Mieszana hodowla bakterii fermentacji mlekowej Lactic acid bacteria	70	30	—	7	15	—	28	55	—	0	0	—
III 1957	Kontrola Control	60	60	40	30	20	30	10	20	30	0	0	0
	L. mesenteroides	93	75	89	5	20	3	2	5	8	0	0	0

W trzeciej serii doświadczeń użyto jako szczepionki tylko *L. mesenteroides*. Szczepiono ogórki I, II i III wyboru. W kontroli znaleziono ogórków pustych 10% w I wyborze, 20% w II wyborze i 30% w III wyborze, ogórków zwiotczałych było 30% w I wyborze, 20% w II wy-

borze i 30% w III wyborze. Szczepienie hodowlą *L. mesenteroides* w znacznym stopniu poprawiło jakość zakiszanego produktu. Po 3-miesięcznym okresie przechowywania znaleziono ogórków zwiotczałych w I wyborze tylko 5%, a w III — 3%, w II natomiast wyborze ilość ogórków z tą wadą była taka sama jak w kontroli. Ogórki puste stanowiły 2, 5 i 8% w odpowiednich wyborach (tab. I). Stwierdzono również, że zalewa ogórków szczepionych hodowlą *L. mesenteroides* miała w porównaniu do kontroli większą kwasowość po 11-dniowym i 3-miesięcznym przechowywaniu. W zawartości kwasu octowego nie stwierdzono istotnych różnic (tab. II).

Tabela II

Zawartość kwasów w zalewie po 11-dniowym i 3,5-miesięcznym przechowywaniu ogórków, w g na 100 ml

Acidity of brine after 11 days and 3,5 months of preservation of cucumbers, in g per 100 ml

Szczepiono bakteriami Bacteria used as starter	Ogólna zawartość kwasów, jako kwas mlekowy Total acidity, as lactic acid		Zawartość kwasu octowego % Acetic acid %		*pH* zalewy *pH* of the brine
	po 11 dniach after 11 days	po 3,5 miesiącach after 3,5 months	po 11 dniach after 11 days	po 3,5 miesiącach after 3,5 months	po 3,5 miesiącach after 3,5 months
Kontrola Control	0,776	0,762	0,064	0,076	3,45
L. mesenteroides	0,988	0,952	0,075	0,083	3,30
L. mesenteroides + mieszana hodowla bakterii fermentacji mlekowej *L. mesenteroides* + lactic acid bacteria	0,904	0,810	0,080	0,075	3,35
Mieszana hodowla bakterii fermentacji mlekowej Lactic acid bacteria	0,804	0,855	0,070	0,071	3,35

WNIOSKI

1. Szczepienie ogórków bakteriami fermentacji mlekowej wpływało korzystnie na jakość gotowego produktu.

2. Najlepsze wyniki uzyskano przy użyciu szczepionki z *L. mesenteroides*.

Należałoby szczegółowo zbadać, jaki jest mechanizm oddziaływania

bakterii *L. mesenteroides* na inne gatunki mikroflory rozwijającej się w zalewie podczas procesu kiszenia.

Oznaczenia zawartości kwasów wykonał mgr J. Kaszyński, wykonanie pracy w Zakładach Kiszarniczych umożliwił ob. W. Marczuk, za co na tym miejscu składam Im podziękowanie.

LITERATURA

Costilow R. N., Coughlin F. M., Robach D. L., Ragheb H. S., 1956: A study of the acid-forming bacteria from cucumber fermentations in Michigan. *Food Res.*, **21**: 27.

Fabian F. W., Allen C. H., 1952: *Aerobacter aerogenes* as a cause of ropy brine in cucumber fermentation. *Food Res.*, **17**: 446.

Nortje B. K., Vaughn R. H., 1953; The pectolytic activity of species of the genus *Bacillus*. Qualitative studies with *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* in relation to the softening of olives and picles. *Food Res.*, **18**: 57.

Pederson C. S., Albury Margaret N., 1953: Factors affecting the bacterial flora in fermenting vegetables. *Food Res.*, **18**: 290.

Vaughn R. H., Levinson J. H., Nagel Ch. W., Krumperman P. H., 1954: Sources and types of aerobic microorganisms associated with the softening of fermenting cucumbers. *Food Res.*, **19**: 494.

Vaughn R. H., Balatsouras G. D., York I. G. K., Nagel Ch. W., 1957: Media for detection of pectinolytic microorganisms associated with softening of cucumbers, olives and other plant tissues. *Food Res.*, **22**: 597.

S. Bujak

INFLUENCE OF LACTIC ACID BACTERIA INOCULATION OF CUCUMBERS ON THE QUALITY OF THE PRODUCT AFTER ITS FERMENTATION

Summary

The purpose of this work was to carry out the fermentation of cucumbers in conditions which secure a good quality of the product after the process.

The investigations were conducted with the variety of cucumbers called „Monastyrska". Experiments on an industrial scale in 3 different combination were made. The cucumbers were inoculated before the fermentation with different strains of lactic acid bacteria. Following strains of bacteria were used for inoculation:

1. Mixture of lactic acid bacteria (*Streptococcus lactis, Lactobacillus plantarum* and *L. brevis*).
2. Mixture of lactic acid bacteria + *Leuconostoc mesenteroides.*
3. *L. mesenteroides.*
4. Control- not inoculated.

After the fermentation the barrels with cucumbers were submersed in water containers and stored for 3 months. After this the soft cucumbers and bloaters were counted. At the same time the organoleptic analysis was made and the lactic and acetic acids content, *pH*, the viable count of bacteria and yeasts in the brine was examined (Tables I and II). The inoculation influenced the quality of the product. The best results were obtained when *L. mesenteroides* was used for inoculation. In comparison with control 6-10 times less of soft cucumbers and 4-5 times less of bloaters were obtained.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9: 205—214

M. Kujawski i *K. Piller*

BADANIA NAD OTRZYMYWANIEM PLEŚNIOWYCH PREPARATÓW ENZYMATYCZNYCH — AMYLOLITYCZNYCH

CZ. II. OPIS MORFOLOGICZNY CZTERECH SZCZEPÓW *ASPERGILLUS ORYZAE* ORAZ WPŁYW CZASU HODOWLI NA ICH AKTYWNOŚĆ AMYLOLITYCZNĄ

Z Katedry Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Krakowie
i z Zakładu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie

Wpłynęło 24 sierpnia 1959 r.

WSTĘP

Udane doświadczenia z posiadanym przez nas szczepem *Aspergillus oryzae* (szczep *3b*) skłoniły nas do przebadania innych dostępnych nam szczepów tego gatunku (Kujawski i Piller 1958).

Mimo niewątpliwych zalet metody podpowierzchniowej, stosowanej przy użyciu *A. niger* (Drews, Specht, Rothenbach 1953, Underkofler, Hickey 1954) dla kultur *A. oryzae*, metoda powierzchniowa wydaje się odpowiedniejsza. Hodowle tego grzyba na otrębach pszennych są podstawą nie tylko badań laboratoryjnych i prób półtechnicznych (Meyrath 1957, Starka 1952, Beran, Burger, Zelenka 1956), lecz także produkcji przemysłowej (Prescott, Dunn 1949, Sotniczenko 1955).

Praca niniejsza obejmuje opis morfologiczno-fizjologiczny 4 szczepów *A. oryzae* (*Kluyver*, *Went*, *Czinań* i *3b*) oraz badania nad wpływem czasu hodowli na aktywność amylolityczną.

BADANIA WŁASNE

METODYKA

Pożywka: We wszystkich doświadczeniach stosowano podłoże z otrąb pszennych i wycierki w stosunku 6 : 4, zwane w niniejszej pracy „mieszanką" (Kujawski, Piller, 1958). Nawilgocone (do 70% wodą studzienną) podłoże umieszczone na szalkach Petriego (Ø 10 cm) w ilości 10 g powietrznie suchej mieszanki, spulchniano szklanym pręcikiem.

Szczepienie: Po wysterylizowaniu (45 minut, 1 atmosfera) i ochłodzeniu, podłoże szczepiono zawiesiną zarodników poszczególnych szczepów. Jako materiału wyjściowego używano kultur 10-14-dniowych, na pożywce Gorodkowej zestalonej agarem. Gęstość zawiesiny zarodników obliczano w komorze Thoma, dobierając rozcieńczenie tak, aby 1 ml zawierał 2,5 miliona spor. Podłoże szczepiono 10 ml sporządzonej w ten sposób zawiesiny, a po spulchnieniu wstawiano do termostatu (30°).

Hodowla: Doświadczenie nad ustaleniem optymalnej temperatury hodowli, o którym wspominano w I części pracy, powtórzono jeszcze raz dla wszystkich 4 szczepów. Stwierdzono niecelowość stosowania temperatury wyższej od 30° w przypadku szczepów *Kluyver, Went* i *3b*. Temperatura wyższa (35°) powoduje szybszy rozwój grzybni wspomnianych szczepów jedynie w ciągu pierwszej doby. Hodowle 4-dniowe nie wykazują różnic ani w rozwoju grzybni, ani w aktywności preparatów. Wyjątek stanowi szczep *Czinań*, który w 35° daje lepsze wyniki niż w 30°. Suma aktywności podłoża* wynosiła dla kultur tego szczepu hodowanych w 30° — 12,19 i 13,60, a dla kultur hodowanych w 35° — 16, 14 i 19,00 g maltozy.

Suszenie: Przerośnięte grzybnią podłoża rozdrabniano i suszono. W ramach tego cyklu doświadczeń suszenie prowadzono bądź w suszarce zwykłej (patrz Cz. I), bądź też stosowano 2-godzinne podsuszenie w suszarce z przewiewem o temperaturze około 45° i następnie 24-godzinne dosuszenie w suszarce zwykłej w tej samej temperaturze.

Wysuszone i utarte preparaty pozostawiano przez kilka dni w temperaturze pokojowej w celu osiągnięcia stałej wilgotności, po czym oznaczano ich aktywność amylolityczną. Zawartość wody w preparatach powietrznie suchych oznaczano na drodze 3-godzinnego suszenia w 105°.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

MORFOLOGICZNY OPIS SZCZEPÓW

Badania wstępne przeprowadzono na 4 szczepach *A. oryzae*: *Kluyver, Went, Czinań* i *3b*. Szczepy te oznaczano w dalszej części pracy symbolami *K, W, Cz* i *3b*.

Za charakterystyczne przyjęto kultury 6-dniowe na agarze Czapeka z 2% sacharozy, szczepione punktowo w centrum szalki (Thom, Raper 1945). Oprócz opisu morfologicznego kolonii określano intensywność rozwoju pleśni (codziennie mierzono średnicę kolonii), a z chwilą osiągnięcia dojrzałości — średnicę główek konidialnych i kształt oraz wielkość zarodników. Ponadto oznaczano średnicę i powierzchnię kolonii w analogicznych kulturach na agarze Czapeka z 2% skrobi oraz powierzchnię strefy zhydrolizowanej łącznie z powierzchnią kolonii.

Szczep *K* otrzymany w 1956 r. z Muzeum Szczepów w Baarn (Holandia), odznacza się białą, delikatną grzybnią, na pożywce ze skrobią bardzo delikatną i puszystą. Zarodnikuje bardzo słabo. Początek zarodnikowania w czwartym dniu hodowli. Kolor zarodników kremowy, na skrobi żółto-tabaczkowy. Długość konidioforów powyżej 1,5 mm, średnica główek konidialnych około 40 μ, zarodniki okrągłe o średnicy 6,5-8,5 μ.

* wyjaśnienie terminu — patrz doświadczenie I

Na podłożu ze skrobią rozwija się dobrze (szósty dzień 23 cm²) i posiada dużą strefę hydrolizy (28 cm²).

Szczep *3b* pochodzący z Pracowni Mikrobiologii Technicznej Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Krakowie, a wyizolowany przez nas na drodze selekcji (Kujawski, Piller 1958), posiada białą i delikatną grzybnię, bardzo podobną do grzybni szczepu *K*; grzybnia na pożywce ze skrobią płoży się, za wyjątkiem puszystej i wybujałej partii środkowej kolonii, w której często występują rozgałęzienia główek konidialnych (Glaubitz 1932). Zarodnikuje słabo. Początek zarodnikowania w piątym, niekiedy w czwartym dniu hodowli. Zarodniki jasnokremowe. Długość konidioforów powyżej 1,5 mm, średnica główek konidialnych około 40 μ, zarodniki okrągłe o średnicy 6,5-9,0 μ. Na podłożu ze skrobią rozwija się bardzo dobrze (szósty dzień — 32 cm²) i posiada bardzo dużą strefę hydrolizy (35 cm²).

Szczep *W* otrzymany w 1956 r. z Muzeum Szczepów w Baarn charakteryzuje się białą, silną i gęstą grzybnią; na pożywce ze skrobią — płaską, o wyraźnie zaznaczających się koncentrycznych strefach rozwoju. Zarodnikuje silnie. Początek zarodnikowania w drugim dniu hodowli. Kolor zarodników ciemnokremowy, przechodzący w jasnobrązowy. Długość konidioforów powyżej 1,5 mm, średnica główek konidialnych około 50 μ, zarodniki okrągłe o średnicy 7,5-8,5 μ. Na pożywce ze skrobią rozwija się dobrze, lecz nieco słabiej niż poprzednie 2 szczepy (szósty dzień 14 cm²) i posiada mniejszą strefę hydrolizy (18 cm²).

Szczep *Cz* przywieziony został z Chin w 1956 r. (Chińskie opracowanie technologiczne, 1956). Cechuje się białą grzybnią o krótkich strzępkach. Zarodnikuje bardzo intensywnie. Początek zarodnikowania w pierwszym dniu hodowli; kolor zarodników zielonooliwkowy. Długość konidioforów powyżej 1,5 mm, średnica główek konidialnych około 40 μ, zarodniki okrągłe o średnicy 4,5-5,0 μ, wg metryki posiadają na powierzchni kolce. Rozwój podobny jak u szczepu *W*; na pożywce ze skrobią nieco silniejszy. Powierzchnia kolonii na pożywce ze skrobią po sześciu dniach 17 cm², a strefa hydrolizy 27 cm².

Intensywność rozwoju 4 wymienionych powyżej szczepów pleśni na agarze Czapeka z sacharozą jest jednakowa. Ich cechy morfologiczne odpowiadają opisanym dla gatunku.

WPŁYW CZASU HODOWLI NA AKTYWNOŚĆ AMYLOLITYCZNĄ BADANYCH SZCZEPÓW

Doświadczenie I (wstępne)

W pierwszej części pracy ustalono optymalny czas hodowli dla *A. oryzae* szczep *3b*, hodowanego na podłożu z otrąb pszennych. Wynosił on 5 dni. Ze względu na zastąpienie otrąb pszennych „mieszanką", jak

Tabela I

Rozwój grzybni czterech szczepów *A. oryzae* na podłożu z mieszanki
Development of four strains of *A. oryzae* on a medium of wheat bran and dried potato pulp (6 : 4)

Dzień hodowli Time of growth in days	Nazwa szczepów — strain			
	Kluyver	*3b*	*Went*	*Czinań*
1	ślady grzybni	ślady grzybni	ślady grzybni	wyraźne ślady grzybni, początki tworzeni główek konidialnych
2	słaba, delikatna grzybnia, przerastająca całe podłoże	delikatna, puszysta grzybnia przerastająca całe podłoże	biała, silna grzybnia, podłoże przerośnięte, ślady zarodnikowania	podłoże całkowicie przerośnięte, strzępki krótkie, bardzo obfite zarodnikowanie, zarodniki zielone
3	grzybnia puszysta, podłoże w postaci placka, silnie przerośnięte	grzybnia biała, silnie rozwinięta, krótka i zwarta, gdzieniegdzie początki zarodnikowania. Podłoże w postaci placka	obfite zarodnikowanie koloru ciemnożółtego. Podłoże w postaci zbitego placka	podłoże w postaci zarodnikującej masy, kruche, rozsypujące się, ale wystarczająco wilgotne
4	grzybnia zwarta, aksamitna, biało-kremowa, przy brzegach szalki zarodnikowanie	jak w 3 dniu, liczne partie zarodników koloru kremowo-beżowego	jak w 3 dniu, kolor zarodników przechodzi w jasno-brązowy	jak w 3 dniu
5	jak w 4 dniu, słabe wydzielanie amoniaku	podłoże rozluźnione	jak w 4 dniu	jak w 3 dniu
6	podłoże wilgotne i miękkie, wydzielanie amoniaku	grzybnia miękka, prawie mazista, silne wydzielanie amoniaku	podłoże wilgotne, wydzielanie amoniaku	jak w 3 dniu
7	jak w 6 dniu	jak w 6 dniu	mokre podłoże, silne wydzielanie amoniaku	podłoże bardziej wilgotne, słabe wydzielanie amoniaku

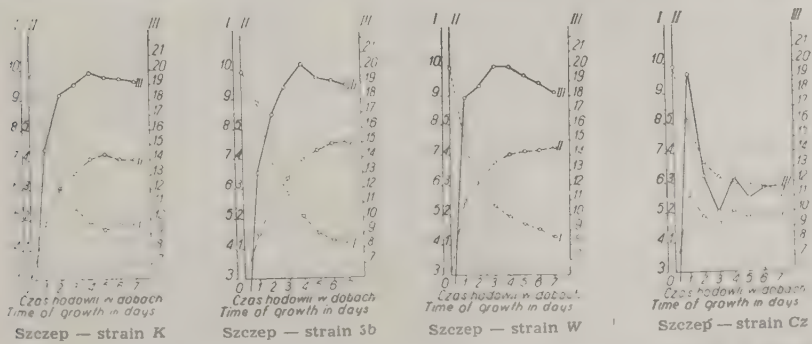
również wprowadzenie nowych szczepów, zagadnienie optymalnego czasu hodowli wymagało ponownego i bardziej szczegółowego opracowania.

W doświadczeniu niniejszym badano wpływ czasu hodowli na aktywność amylolityczną szczepów: *Went, Kluyver, Czinań* w porównaniu ze szczepem *3b*, przy zastosowaniu podłoża z „mieszanki".

Doświadczenie to nastawiono w 2 równoległych powtórzeniach. W czasie hodowli obserwowano rozwój grzybni i intensywność zarodnikowania oraz zmiany zachodzące w podłożu (ilustruje to tab. I).

Po każdym dniu hodowli przerośnięte grzybnią podłoże suszono, ucierano i ważono.

Obserwowano już uprzednio dość duże i stałe ubytki suchej masy podłoża w okresie hodowli. Ponieważ straty te były dość znaczne (ciężar wysuszonych preparatów w 5, 6 i 7 dniu stanowił niekiedy tylko 50% ciężaru wyjściowego), nasunęła się myśl, czy przeliczenie aktywności amylolitycznej na 1 g preparatu, w doświadczeniu nad wpływem czasu



Rys. 1. Zależność masy podłoża, aktywności 1 grama i sumy aktywności od czasu hodowli (preparaty suszone bez przewiewu)

Krzywa: I — powietrznie sucha masa podłoża w gramach, II — aktywność 1 g preparatu w gramach maltozy w przeliczeniu na powietrznie suchą masę, III — suma aktywności podłoża w gramach maltozy w przeliczeniu na powietrznie suchą masę

Fig. 1. Effect of the time of incubation of the mould on the mass of the medium, activity of 1 g and total activity (preparation dried without aeration)

Curve: I — air-dry mass of the medium, in grams, II — activity of 1 gram of preparation, in grams of maltose, calculated per air-dry matter, III — total activity of preparation in grams of maltose, calculated per air-dry matter

inkubacji, daje porównywalne wyniki. Dlatego też we wszystkich doświadczeniach aktywność amylolityczną przeliczano zarówno na 1 g, jak i na całość preparatu (aktywność 1 g × ilość g preparatu)*. Wzrost aktywności 1 g mógł być bowiem pozorny i spowodowany nie rzeczy-

* Aktywność tę w dalszej części pracy nazywamy sumą aktywności podłoża.

wistym zwiększeniem ilości enzymów w podłożu, lecz spadkiem suchej masy podłoża. Wyniki tego doświadczenia przedstawiono na rysunkach 1a, b, c i d.

Doświadczenie II

Suszenie w suszarce bez przewiewu przebiega powoli (20-24 godzin), a tym samym przedłuża czas rozwoju grzybni. W pierwszych 2 dniach hodowli ma to szczególnie poważny wpływ na aktywność preparatów i może dać błędne wskazówki odnośnie do faktycznej ilości enzymów, wyprodukowanej przez grzybnię w ciągu 24 lub 48 godzin rozwoju. Ten dodatkowy wpływ procesu suszenia preparatów powinien być coraz słabszy w miarę przedłużania czasu hodowli.

Przy otrzymywaniu preparatów wyłącznie z tego samego okresu hodowli, dotychczasowy sposób suszenia wydaje się zupełnie wystarczający; przy porównywaniu jednak aktywności preparatów z różnych okresów hodowli (1-7 dni) możliwie szybkie wysuszenie materiału uważaliśmy za konieczne, a uzyskane wyniki za jedynie miarodajne.

Doświadczenie niniejsze nastawione w 2 równoległych powtórzeniach wykonano analogicznie do doświadczenia I. Podłoże suszono w suszarce zwyczajnej z zastosowaniem 2 föhnów, co pozwalało nam już w ciągu 1,5-2 godzin uzyskać wystarczająco suchy materiał, a tym samym zahamować rozwój pleśni. Dalsze dosuszanie prowadzono w suszarce bez przewiewu.

Wyniki tego doświadczenia potwierdziły nasze przypuszczenia. Aktywność 1 g preparatu wszystkich 4 szczepów jak i suma aktywności podłoża z pierwszego i drugiego dnia hodowli były w przypadku suszenia z przewiewem niższe. Natomiast już po upływie 3 dni hodowli różnice te malały. Przykładowy wycinek niniejszego doświadczenia ujęto w tabeli II.

Optymalny czas hodowli, który dla szczepów *K*, *W* i *3b* przypadał na 3 i 4 dzień, nie uległ poważniejszym przesunięciom mimo różnego sposobu suszenia. Natomiast proces kilkunastogodzinnego suszenia materiału w 40° wywiera wybitnie dodatni wpływ na nisko aktywny szczep *Czinań*, powodując gwałtowny wzrost aktywności preparatu z 1 dnia hodowli. Maksimum to, przy suszeniu z przewiewem, jest nie tylko przesunięte na drugą dobę hodowli, ale i znacznie niższe.

Doświadczenie III

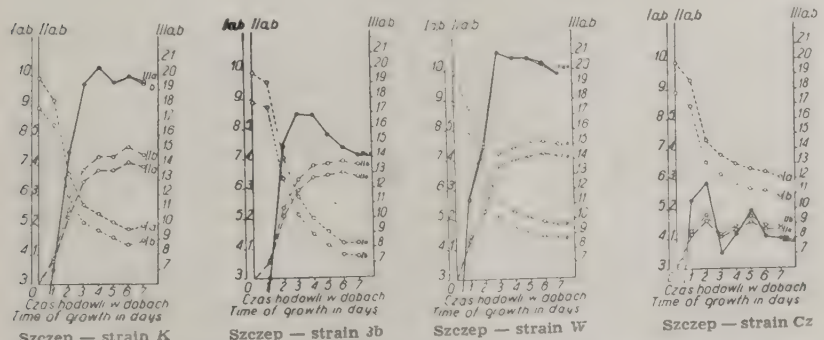
Przyczyną obserwowanego spadku masy jest oddychanie organizmu. Pozostało jednak do rozwiązania, czy i jaki wpływ wywiera tu rozmaita niewątpliwie hygroskopijność preparatów pochodzących z różnych okresów hodowli. Dlatego postanowiono oznaczyć zawartość wody w preparatach, a aktywność preparatów przeliczać także na suchą masę podłoża. Opisane poniżej doświadczenie, które jest zasadniczo rozwinięciem

Tabela II

Różnice pomiędzy aktywnością 1 g preparatu suszonego bez przewiewu a preparatu suszonego z przewiewem

Difference in activity of 1 g of preparation dried without aeration and dried with aeration

Czas hodowli w dobach Time of growth in days	Aktywność 1 g preparatu Activity of 1 gram of preparation					
	Szczęp *Kluyver* Strain *Kluyver*			Szczep *Went* Strain *Went*		
	bez przewiewu without aeration	z przewiewem with aeration	różnica difference	bez przewiewu without aeration	z przewiewem with aeration	różnica difference
1	1,85	0,75	+1,10	2,45	1,30	+1,15
2	3,05	2,25	+0,80	3,10	2,25	+0,85
3	3,55	3,45	+0,10	3,75	3,80	—0,05
4	4,00	3,80	+0,20	4,00	3,95	+0,05
5	4,15	3,80	+0,35	4,10	4,10	0,00
6	4,00	4,10	—0,10	4,15	4,20	—0,05
7	3,95	3,95	0,00	4,25	4,10	+0,15



Rys. 2. Zależność masy podłoża, aktywności 1 grama i sumy aktywności od czasu hodowli (preparaty suszone z przewiewem)

Krzywa: I a, b — powietrznie sucha (a) i sucha (b) masa podłoża w gramach, II a, b — aktywność 1 g preparatu w gramach maltozy w przeliczeniu na powietrznie suchą masę (a) i suchą masę (b), III a, b — suma aktywności podłoża w gramach maltozy w przeliczeniu na powietrznie suchą (a) i suchą (b) masę

Fig. 2. Effect of the time of growth of the mould on the mass of the medium, activity of 1 g, and total activity of preparations dried with aeration (the moisture content of the preparation considered)

Curve: I a, b — air-dry (a) and dry (b) mass of the medium in grams, II a, b — activity of 1 gram of preparation, in grams of maltose, calculated per air-dry (a) and dry (b) matter, III a, b — total activity of preparation in grams of maltose, calculated per air-dry (a) and dry (b) matter

poprzedniego, nastawiono w 4 równoległych seriach. Codziennie wybierano losowo 4 szalki, a pochodzące z nich preparaty łączono po wysuszeniu po dwa i ucierano razem. W sumie otrzymano zatem dla każdego szczepu dwa preparaty dziennie. Oznaczenie aktywności oraz masy podłoża powietrznie suchego w porównaniu z suchym podłożem, dla wszystkich 4 szczepów przedstawiono na rysunkach 2a, b, c i d.

Uzyskane wyniki przekonały nas, że różnice w masie preparatów między poszczególnymi dniami hodowli należy przypisać wyłącznie procesowi intensywnego oddychania. Niewielkie wahania w zawartości wody nie zmieniają charakteru krzywej aktywności, ani krzywej masy preparatu. Iloczyn ich (krzywa sumy aktywności) nie ulega zmianie. Dlatego też oznaczenie zawartości wody w powietrznie suchych preparatach wydaje się w przyszłości niecelowe.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zbadane przez nas 4 szczepy *A. oryzae,* mimo ich różnego pochodzenia, odznaczają się podobnymi cechami morfologicznymi. Pewien wyjątek stanowi tu szczep *Czinań,* o stosunkowo słabo rozwiniętej grzybni oraz mniejszych i wyraźnie zielonych zarodnikach. Grzybnie pozostałych trzech szczepów są białe i puszyste, szczególnie zwarta u szczepu *Went.* Ze względu na intensywność i obfitość zarodnikowania można by wymienione szczepy zaliczyć do 2 grup fizjologicznych:

a. Szczepy *K* i *3b* — puszyste i słabo zarodnikujące

b. Szczep *Cz* — bardzo łatwo i silnie zarodnikujący.

Szczep *W,* który posiada silną i dobrze rozwiniętą grzybnię, a jednocześnie odznacza się łatwością zarodnikowania, zajmuje najwidoczniej pozycję pośrednią.

Rozwój tych pleśni w ciągu 7-dniowej hodowli na podłożu z „mieszanki" przebiega podobnie (tabela I). Tylko szczep *Czinań* rozwija się bardziej intensywnie; już w ciągu 24 godzin tworzy główki konidialne, a w drugiej dobie hodowli całe podłoże pokryte jest masą zarodników.

Pozostałe trzy szczepy wykazują ślady nie zarodnikującej grzybni (szczególnie słabej u szczepu *K*), która jednak po 2 dniach hodowli przerasta silnie całe podłoże w postaci białej, puszystej pilśni. W 3 dniu hodowli szczep *W* zarodnikuje obficie, widać też początki zarodnikowania u szczepu *3b*, którego kultura w 4 dniu posiada już liczne, dość bogato zarodnikujące partie. Szczep *K* w czasie całego okresu hodowli z reguły nie zarodnikował. Spotykano tylko ślady zarodnikowania przy brzegach szalki, w miejscu zetknięcia się grzybni ze szkłem. W 5 dniu hodowli przeważają już procesy dysymilacji, które na skutek wyczerpania się substancji odżywczych w podłożu prowadzą szybko (6 i 7 dzień) do autolizy.

W ciągu pierwszych trzech dni hodowli aktywność 1 g otrzymanych preparatów szybko wzrastała, utrzymując się później na nieco tylko wyższym poziomie (patrz rysunki).

Natomiast suma aktywności podłoża osiągnęła swoje maksimum u szczepu *Cz* w 2 dniu hodowli, u szczepu *W* w 3 dniu, a u szczepów *K* i *3b* — w 3-4 dniu hodowli. Maksimum to było stosunkowo niskie dla szczepu *Cz* (doświadczenie II: 16,3 i 16,4; doświadczenie III: 11,5 i 12,0), a znacznie wyższe dla szczepu *3b* (doświadczenie II: 18,9 i 19,0; doświadczenie III: 16,8 i 17,7). Najlepsze wyniki uzyskano przy szczepie *K* (doświadczenie II: 20,0 i 19,6; doświadczenie III: 20,0 i 21,1) oraz *W* (doświadczenie II: 20,5 i 20,4; doświadczenie III: 21,0 i 21,4).

Po osiągnięciu najwyższej wartości widoczny był wyraźny spadek sumy aktywności podłoża, utrzymujący się do końca trwania hodowli. Należałoby zatem sądzić, że miarodajna jest nie tyle aktywność 1 g preparatu, ile suma aktywności całego podłoża. Stwierdziliśmy bowiem, że wzrost aktywności 1 g preparatu z 5, 6 i 7 dnia hodowli spowodowany jest nie faktycznym zwiększeniem ilości enzymów w podłożu, lecz spadkiem suchej masy.

WNIOSKI

W I części niniejszej pracy jako ocenę aktywności amylolitycznej przyjmowano aktywność 1 g. Dodatkowe wprowadzenie w II części pojęcia „suma aktywności podłoża" (iloczyn aktywności 1 g i masy podłoża) pozwala niewątpliwie na wyznaczenie bardziej ekonomicznego czasu hodowli. Określanie aktywności 1 g preparatu pozostaje mimo to miernikiem jego oceny.

Ze względu na wysoką aktywność otrzymanych preparatów, szybki rozwój grzybni i bogate zarodnikowanie, szczep *Went A. oryzae* wydaje się najbardziej godny uwagi. Przy odpowiednim zaszczepieniu (nie mniej niż 250 000 zarodników na 1 g powietrznie suchego podłoża) 3-dniowy czas hodowli jest zupełnie wystarczający dla uzyskania najwyższej wydajności enzymów amylolitycznych. Przekroczenie tego czasu hodowli nie tylko nie daje lepszych rezultatów, ale powoduje spadek sumy aktywności podłoża.

Niewystarczające zarodnikowanie szczepów *K* i *3b* (nie ustępujących wiele pod względem aktywności amylolitycznej szczepowi *W*) może stanowić przeszkodę w stosowaniu tych szczepów w skali półtechnicznej lub technicznej.

Szczep *Czinań* mimo wielkiej łatwości zarodnikowania daje znacznie gorsze wyniki i w opisanych przez nas warunkach nie wydaje się odpowiedni do produkcji preparatów enzymatycznych. Wysoka jednak aktywność preparatu z 24-godzinnej hodowli, suszonego bez przewiewu (rys. 1d)

wskazywałaby na dodatni wpływ wyższej temperatury na ten szczep. Wyniki uzyskane z kulturami tego szczepu w temperaturze 35° (str. 206) w pełni potwierdzają to spostrzeżenie, sugerując potrzebę dalszych badań w tym kierunku.

Panu Profesorowi Drowi Franciszkowi Nowotnemu składamy serdeczne podziękowanie za kierownictwo pracą.

LITERATURA

Beran K., Burger M., Zelenka S., 1956: Nove poznatky při použiti plisnových amylotických preparatů pro zcukřovani bramborovych zápar. *Česksl. Mikrobiologie*, **1**: 193.

Chińskie Opracowanie Technologiczne otrzymywania i sposobu użycia preparatów amylolitycznych z *A. oryzae*. 1956 (maszynopis w j. rosyjskim).

Drews B., Specht H., Rothenbach E., 1953: Zur submersen Züchtung amylolytischer Schimmelpilze. *Die Brantweinwirtschaft*, **75**: 179.

Glaubitz M., 1932: Atlas der Gärungsorganismen. Berlin, Paul Parey Verl.

Kujawski M., Piller K., 1958: Badania nad otrzymywaniem pleśniowych preparatów enzymatycznych — amylolitycznych. Cz. I. *Acta Microbiol. Polon.*, **7**: 299.

Meyrath J., 1957: Über die Bildung von Amylasen durch *A. flavus-oryzae.*, Verl. P. C. Keller Wintethur.

Prescott S., Dunn C., 1949: Industrial Microbiology. Wyd. rosyjskie, 1952. Moskwa I. I.

Sotniczenko L. P., 1955: O czasticznoj zamienie zjernowogo sołoda plesniewymi gribami. *Spirtowaja Prom.*, **1**: 39.

Štarka J., 1952: Priprava plisnových amylolytických preparatů na pšeničnych otrubach. *Prum. Potravin*, **3**: 488.

Thom Ch., Raper K. B., 1945: A manual of the *Aspergilli*. Baltimore.

Underkofler L. A., Hickey R. J., 1954: Industrial fermentations. Chem. Publ. Co., N. York.

M. Kujawski and *K. Piller*

STUDIES ON THE PRODUCTION OF FUNGAL AMYLASES

II. MORPHOLOGY OF FOUR STRAINS OF *ASPERGILLUS ORYZAZE* AND THE EFFECT OF THE TIME OF GROWTH ON THEIR AMYLOLYTIC ACTIVITY

Summary

1. Four strains of *A. oryzae*: *Kluyver*, *3b*, *Went*, *Chinang* were cultivated on a medium consisting of wheat bran and dried potato pulp, for a period of 1-7 days.

2. There was observed during this time a decrease of dry mass of the medium as well as an increase of the enzymatic activity of 1 g of the preparation. Moreover the total activity of the medium was calculated.

3. Total activity of the medium reached the maximal values:
for *Chinang* — on the second day of growth (11,7-16,3)
for *Went* — on the third day of growth (20,4-21,2)
for *Kluyver* — on the third or fourth day of growth (19,8-20,5)
for *3b* — on the third or fourth day of growth (17,2-18,9)

4. The highly active and richly sporulating strain *Went* seems to be most suitable for further research on obtaining amylolytic mould preparations.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 215—230

E. Kocwa, K. Matusiak i *H. Wcisło*

WYODRĘBNIANIE AKTYWNYCH SZCZEPÓW *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* ZE ŚRODOWISK NATURALNYCH

Z Zakładu Mikrobiologii Technicznej Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Krakowie

Wpłynęło 24 kwietnia 1958 r.

WSTĘP

Produkcja acetonu i butanolu oparta na procesie fermentacyjnym osiągnęła wysoką wydajność rozpuszczalników dopiero dzięki zastosowaniu szczepu *Clostridium acetobutylicum*, wyodrębnionego przez Weizmanna w 1912 r. Szczep ten, pierwotnie nazwany przez odkrywcę *Bacillus granulobacter pectinovorum*, odznaczał się znacznie większą aktywnością fermentacyjną niż szczepy poprzednio wyodrębnione przez innych badaczy (Prescott i Dunn 1949). Odkrycie Weizmanna zapoczątkowało cały szereg prac nad poszukiwaniem aktywnych szczepów *Cl. acetobutylicum* (McCoy, Fred, Peterson, Hastings 1926, Weyer, Rettger 1927, Beesch 1948, 1953).

Wśród licznych wyodrębnionych szczepów, *Cl. propyl-butylicum*, *B. tetryl*, *Cl. celerifactor*, posiadały zdolność energicznego fermentowania podłoża zawierającego cukier inwertowany. Inne szczepy jak *Cl. saccharo-acetobutylicum* oraz niektóre odmiany *Cl. saccharo-butyl-acetonicum-liquefaciens* były zdolne do użytkowania sacharozy z melasu bez uprzedniej inwersji. Znane są wreszcie liczne szczepy jak np. wyodrębniony w Japonii w 1949 r. pod nazwą *Cl. caneboi*, odróżniające się od poprzednio wymienionych zdolnością energicznego fermentowania zarówno podłoży skrobiowych jak i cukrowych (Underkofler i Hickey 1954).

Praca niniejsza była dotowana przez Komitet Mikrobiologiczny PAN w 1954 r. następnie zaś w latach 1955-1957 została włączona do tematyki Zakładu Mikrobiologii Technicznej Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego.

Jakkolwiek przemysł acetono-butanolowy dysponuje dzisiaj dużą ilością różnych szczepów, to jak podaje Underkofler (1954, str. 353) „ideal cultures are evidently not readily found".

Dlatego też prace nad wyodrębnianiem nowych szczepów są ciągle aktualne.

Celem niniejszej pracy było:

1. Poszukiwanie *Clostridium acetobutylicum* w środowiskach naturalnych i surowcach roślinnych.

2. Wyodrębnienie czystych szczepów i ocena ich aktywności fermentacyjnej na podłożu skrobiowym i melasowym w porównaniu ze szczepem fabrycznym.

MATERIAŁ I METODY

Wyjściowym materiałem do badań były próbki pochodzące z 14 różnych środowisk, oznaczanych odpowiednio symbolami (tab. I).

W celu wykrycia *Cl. acetobutylicum* postępowano w następujący sposób:

1. Próbki badanych środowisk wprowadzano do probówek z wyjałowioną wodą destylowaną. Uzyskaną zawiesinę ogrzewano przez 2 minuty w celu eliminacji form wegetatywnych i mniej opornych przetrwalników. Tak przygotowany materiał służył do zaszczepiania 20-procentowego zacieru ziemniaczanego (po 20 probówek à 10 ml dla każdego środowiska).

2. Zaszczepiony zacier ziemniaczany ponownie ogrzewano, po czym przeprowadzano fermentację w 37°.

3. Dla określenia przebiegu fermentacji obserwowano co 2 godziny zmiany zachodzące w podłożu. Dla oceny poszczególnych stadiów fermentacji przyjęto następującą skalę pięciostopniową:

0 — brak objawów fermentacji
1 — pierwsze objawy fermentacji w postaci wydzielania gazów
2 — częściowe podniesienie stałych części zacieru
3 — podniesienie 2/3 stałych części zacieru
4 — całkowite podniesienie stałych części zacieru.

4. Zaciery wykazujące fermentację z obfitym wydzielaniem gazów używano do zaszczepienia drugiej partii 20-procentowego zacieru ziemniaczanego, po 20 probówek dla każdego środowiska. Następnie, w celu wyodrębniania czystych kultur, wybierano zaciery, w których występowało obfite wydzielanie gazów, podnoszenie stałych części zacieru oraz zapach charakterystyczny dla fermentacji acetono-butanolowej.

5. Wyodrębnianie czystych kultur prowadzono metodą płytkową. Dla uzyskania warunków beztlenowych zastosowano metodę Marschala i Nordbya (Manual of methods for pure culture study of bacteria 1952) i pożywkę Kutzenocha i Aschnera (1952). Po 36-48 godzinach hodowli (37°) przeszczepiano po 10 pojedynczych kolonii na 20-procentowy zacier ziemniaczany, obserwując, jak poprzednio, przebieg fermentacji.

6. Najlepiej fermentujące czyste kultury poddano badaniom porównawczym na następujących podłożach: a) sześcio-, dziewięcio- i dziesięcio-procentowy zacier jęczmienny, b) zacier melasowo-mączny, c) pięcio-, sześcio-, siedmio, i ośmio-procentowy zacier melasowy.

7. Rozmnożenie czystych kultur I generacji prowadzono w 20-procentowym zacierze ziemniaczanym (probówki), II generacji — w 6-procentowym zacierze jęczmiennym (małe kolbki), III generacji — w podłożach o składzie uzależnionym od celu doświadczenia. Ilość stosowanych podłoży opierano na schemacie fabrycznym.

8. Stosowana do doświadczeń mąka zawierała 57,3% cukru, melas zaś 51.02% o. Sterylizację podłoży skrobiowych o objętości do 1 litra prowadzono przez 1-2 godziny przy nadciśnieniu 1 atmosfery; powyżej 1 litra przez 2 godziny przy nadciśnieniu 2 atmosfer. Zaciery melasowe wyjałowiano w 100° przez 1 godzinę.

9. Przed każdorazowym rozmnażaniem kultur na zacierze ziemniaczanym stosowano 1-minutowe ogrzewanie w temperaturze 100°.

10. Wszystkie doświadczenia powtarzano 3-5-krotnie, każdorazowo w 2 równoległych powtórzeniach. W tabelach podano średnie wyniki z co najmniej 6 prób.

METODY ANALITYCZNE

1. Kwasowość ogólną oznaczano w 10 ml podłoża przy pomocy 1N NaOH w obecności fenolftaleiny.

2. Aceton oznaczano metodą Messingera (1888), zmodyfikowaną przez Goodwina w 1920 r. (Bernhauer 1939).

3. Butanol i etanol oznaczano metodą utleniania do odpowiednich kwasów (Stahly, Osburn, Werkman 1934), uwzględniając odnośne normy resortowe (Norma resortowa MPRiS A-13 1954).

4. *pH* ustalano przy pomocy titroskopu.

5. Czas odbarwiania błękitu metylenowego ustalano w 10 ml zacieru (Kovats i inni 1958).

6. Stopień odfermentowania wyrażano w stopniach Ballinga.

7. Cukier wyjściowy i nie odfermentowany oznaczano metodą Bertranda.

METODY IDENTYFIKACJI SZCZEPÓW

1. Morfologię komórek bakteryjnych i przetrwalników ustalano na pożywce Beescha (1948).

2. Morfologię kolonii ustalano na pożywce Kutzenocha i Aschnera.

3. Barwienie metodą Grama, reakcję na granulozę, ruchliwość, reakcję z mlekiem lakmusowym, wytwarzanie indolu, stosunek do tlenu ustalano ogólnie przyjętymi metodami (Przesmycki 1951, Manual of methods for pure culture study of bacteria 1952).

4. Zdolność fermentowania cukrów i alkoholi badano na wodzie drożdżowej z dodatkiem 2% badanych substancji oraz czerwieni obojętnej jako wskaźnika. Wprowadzane paski pociętej bibuły filtracyjnej ułatwiały obserwację przebiegu fermentacji (wydzielanie gazów). Na bulionie, pożywce syntetycznej Robinsona (1922) oraz pożywce syntetycznej Speakmana (1923) nie otrzymano rozwoju.

5. Badania prowadzono w temperaturze optymalnej 37°; jedynie przy ustalaniu morfologii komórek wegetatywnych i przetrwalników zgodnie z Beeschem stosowano temperaturę 30°.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

A. FERMENTACJA WSTĘPNA

W celu wykrycia obecności bakterii acetono-butanolowych w 14 badanych środowiskach, przygotowano 280 probówek z zacierem ziemniaczanym 20%. Zaciery zaszczepiono przygotowaną uprzednio zawiesiną

Tabela I

Wyniki wstępnej fermentacji 20-procentowego zacieru ziemniaczanego szczepionego próbkami różnych środowisk

Results of the primary fermentation of 20% potato-mash. Inoculation with samples from various natural sources

Fermentacja wg skali 5-stopniowej Intensity of fermentation expressed in five degrees scale		Symbol badanego środowiska Letters indicating the source of samples *													
		A	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*	*G*	*H*	*I*	*J*	*K*	*L*	*M*	*N*
		Ilość fermentacyjnych probówek w których zaszła fermentacja po 24 godz. — Number of tubes in which fermentation was observed after 24 hours													
0	brak oznak fermentacji no fermentation	8	17	2	3	0	2	8	0	19	14	18	5	6	0
1	wydzielanie gazów gas-production	4	3	3	1	0	3	11	0	0	5	2	7	5	5
2	częściowe podniesienie zacieru some of the solid particles of mash rised upwards	4	0	3	3	8	5	1	3	0	1	0	4	5	
3	podniesienie 2/3 zacieru the 2/3 of solid particles rised upwards	3	0	10	10	7	9	0	6	0	0	0	3	2	10
	całkowite podniesienie zacieru all solid particles rised upwards	1	0	2	3	5	1	0	11	1	0	0	1	2	0
Ilość badanych probówek Number of tubes examined		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

* *A* — gleba ogrodowa (Bieżanów k. Krakowa) — garden soil
B — gleba próchniczna (Bieżanów k. Krakowa) — humus soil
C — gleba z grobli między stawami rybnymi w Gołyszu — soil from the dike among fish ponds in Gołysz
D — muł rzeczny (dno rzeki Serafy, Bieżanów) — mud from the river Serafa
E — muł z dna stawu nr 4 (Gołysz) — mud from the fish pond No 4
F — muł z dna stawu nr 6 (Gołysz) — mud from the fish pond No 6
G — glina (Glinniki k. Wieliczki) — clay soil
H — woda rzeczna (rzeka Serafa, Bieżanów) — water from the river Serafa
I — melas z Cukrowni Łubna w Kazimierzy Wielkiej — molasse
J — melas z Cukrowni Klecina — molasse
K — melas z Cukrowni Opalenica — molasse
L — ziemniak wiosenny (handlowy) — young grown potato-bulb
M — ziemniak zeszłoroczny (handlowy) — late grown potato-bulb
N — mąka jęczmienna (handlowa) — barley-meal

badanych próbek w wodzie destylowanej, a następnie poddano je 1-minutowemu ogrzewaniu w 100°. Dla każdego środowiska przeznaczono po 20 probówek z zacierem, które oznaczano symbolami literowymi środowisk oraz numerami porządkowymi (np. *A*1 do *A*20).

Tabela II

Powtórna fermentacja 20-procentowego zacieru ziemniaczanego przy użyciu mieszanych kultur z próby wstępnej

Results of the secondary fermentation of 20% potato-mash. Inoculation with mixed cultures selected in primary fermentation

Fermentacja w skali 5-stopniowej Intensity of fermentation expressed in five degrees scale	Symbole kultur mieszanych Denomination of the mixed cultures: ilość fermentacyjnych probówek, w których zaszła fermentacja po 24 godz. — number of tubes in which fermentation was stated after 24 hours													
	A/7	*B*/11	*C*/4	*D*/1	*E*/12	*F*/2	*G* 2	*H* 13	*I*.3	*J*/4	*K*/3	*L*/1	*M*.15	*N*/5
0 brak oznak fermentacji no fermentation	3	5	0	6	0	0	10	0	4	5	10	5	1	1
1 wydzielanie gazów gas-production	5	3	2	4	0	0	8	3	3	4	6	1	2	2
2 częściowe podniesienie zacieru some of the solid particles of mash rised upwards	2	4	4	3	4	4	2	2	2	10	4	5	7	5
3 podniesienie 2/3 zacieru the 2/3 of solid particles rised upwards	2	4	9	3	7	3	0	5	10	1	0	6	2	12
4 całkowite podniesienie zacieru all solid particles rised upwards	8	4	5	4	9	13	0	10	1	0	0	3	8	0
Ilość badanych probówek Number of tubes examined	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

W czasie 24-48-godzinnej fermentacji w 37° obserwowano w odstępach 2-godzinnych zmiany zachodzące w podłożach. Otrzymane wyniki zawiera tabela I w interpretacji skali pięciostopniowej.

Występowanie objawów fermentacji stwierdzono w zacierach zawierających próbki wszystkich badanych środowisk. Szczególnie burzliwa fermentacja wystąpiła w próbach *C*, *D*, *E*, *F* i *H*. Próby te nie wydzie-

Tabela III

Fermentacja 20-procentowego zacieru ziemniaczanego przez czyste szczepy bakterii

Results of fermentation of 20% potato-mash. Inoculation with pure strains of bacteria

Fermentacja wg skali 5-stopniowej Intenisty of fermentation expressed in five degrees scale		Symbole czystych szczepów Denominations of pure strains of bacteria													
		A/7	*B/11*	*C/4*	*D/1*	*E/12*	*F/2*	*G/2*	*H/13*	*I/3*	*J/4*	*K/3*	*L/1*	*M/15*	*N/5*
		ilość fermentacyjnych probówek, w których zaszła fermentacja po 24 godz. — number of tubes in which fermentation was stated after 24 hours													
0	brak oznak fermentacji no fermentation	0	3	0	3	0	0	10	6	10	3	10	2	1	9
1	wydzielanie gazów gas-production	3	1	2	3	1	0	0	1	0	3	0	1	2	0
2	częściowe podniesienie zacieru some of the solid particles of mash rised upwards	1	2	3	1	2	2	0	2	0	3	0	3	1	0
3	podniesienie 2/3 zacieru the 2/3 of solid particles rised upwards	1	3	4	1	7	2	0	1	0	1	0	2	0	1
4	całkowite podniesienie zacieru all solid particles rised upwards	5	1	1	2	0	6	0	0	0	0	0	2	6	0
Ilość przebadanych czystych kultur (pojedynczych kolonii) Number of pure strains examined (single colonies)		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

lały jednak zapachu charakterystycznego dla fermentacji acetono-butanolowej. Typowe objawy dla wymienionego procesu wystąpiły w próbkach *A*, *L*, *M* oraz nieco słabiej przy próbie *N*.

Uwzględniając szybkość zapoczątkowania fermentacji, wybrano zaciery fermentujące najszybciej, a mianowicie: *A*7, *B*11, *C*4, *D*1, *E*12, *F*2, *G*2, *H*13, *I*3, *J*4, *K*3, *L*1, *M*15, *N*5. Zaciery te przechowywano przez kilka dni potrzebnych do wytworzenia przetrwalników, po czym użyto je do szczepienia nowej partii zacieru ziemniaczanego. W tabeli II przedstawiono otrzymane wyniki.

Typowe dla *Cl. acetobutylicum* objawy fermentacji stwierdzono tylko w próbach: *A*7, *L*1, *M*15. Pozostałe próby wykazały mniej lub więcej burzliwą fermentację z wydzieleniem gazów, jednak nietypową dla poszukiwanych bakterii. Mimo to, z materiału powtórnej fermentacji wszystkich środowisk wyosobniono czyste hodowle bakterii o charakterze beztlenowców, posługując się metodą płytkową. Następnie po 10 kolonii przeszczepiono z podłoża stałego na 20-procentowy zacier ziemniaczany. Dla oznaczenia czystych kultur, obok wprowadzonych uprzednio symboli prób, umieszczono nadto numery porządkowe dla każdej z kolonii np. *A*7/1 do *A*7/10.

Wyniki fermentacji przy użyciu czystych kultur przedstawiono w tabeli III, stosując ocenę przebiegu fermentacji w sposób uprzednio opisany.

Jakkolwiek całkowite podniesienie zacieru wystąpiło w nielicznych probówkach *B*11, *C*4, *D*1, *F*2, to tylko próby *A*7, *L*1, *M*15 wykazały charakterystyczne oznaki dla fermentacji acetono-butanolowej. Z prób tych wybrano do dalszych badań: *A*7/2, *A*7/5, *L*1/1, *L*1/4, *L*1/9, i *M*15 7, to jest szczepy, które najszybciej rozpoczynały fermentację. Zostały one rozmnożone na 20-procentowym zacierze ziemniaczanym w I generacji, na 6-procentowym zacierze jęczmiennym w II i III generacji. Bakterie III generacji po przejściu okresu przetrwalnikowania przenoszono do probówek. Materiałem tym posługiwano się w dalszych badaniach.

Tabela IV

Wyniki fermentacji 7 szczepów bakterii acetono-butanolowych na 10-procentowym zacierze jęczmiennym
Results of fermentation of 10% barley-mash. Inoculation with 7 pure strains

Symbol szczepu Denominations of strains	Kwasowość ogólna w ml 0,1 N NaOH/10 ml zacieru — Total titrable acidity in ml of 0,1 N NaOH per 10 ml of medium		Aceton — Acetone g/l	
	48 godzin 48 hours	60 godzin 60 hours	48 godzin 48 hours	60 godzin 60 hours
*A*7/2	5,8	6,2	4,26	3,34
*A*7/5	5,7	5,8	3,88	3,77
*L*1/1	5,8	5,4	3,62	3,45
*L*1/4	6,0	5,7	3,47	4,17
*L*1/9	5,5	5,6	3,53	3,78
*M*15/7	5,3	5,7	3,75	3,33
Rb	6,0	5,8	3 53	3,84

Celem dalszych doświadczeń była ocena aktywności wyodrębnionych szczepów przy równoczesnym porównaniu jej z aktywnością przemysłowej kultury, oznaczonej symbolem *Rb*, a służącej jako wzorzec. Do próby tej użyto 10-procentowego zacieru jęczmiennego stanowiącego w pewnym sensie podłoże selektywne, z łatwością fermentowane jedynie przez silne szczepy. Wyniki porównawczych fermentacji przedstawiono w tabeli IV.

Jako kryterium aktywności fermentacyjnej przyjęto ilość wytwarzanego acetonu w najkrótszym czasie. Jak wiadomo, zawartość acetonu po osiągnięciu maksimum spada. Z tego względu oznaczano aceton w dwu etapach fermentacji, a mianowicie po 48 i 60 godzinach. Uwzględniając stwierdzoną różnicę w zawartości acetonu po 48 i 60 godzinach, uznano za najlepsze, najszybciej prowadzące fermentację szczepy *A*7/2 i *M*15/7. Porównując następnie wyniki uzyskane przez wybrane szczepy *A*7/2 i *M*15/7 z otrzymanymi przy użyciu fabrycznego szczepu *Rb*, stwierdzono u tego ostatniego wolniejszy przebieg fermentacji.

W dalszych badaniach używano dla szczepu *A*7/2 skróconego symbolu *A*, zaś dla szczepu *M*15/7 symbolu *M*.

B. FERMENTACJA NA ZACIERACH O RÓŻNYCH STĘŻENIACH MELASU

Ze względu na to, że w Polsce surowcem stosowanym do produkcji rozpuszczalników jest melas, konieczne było zbadanie zdolności fermentacyjnej na podłożach melasowych. W tym celu przeprowadzono próby fermentacyjne na zacierach o trzech stężeniach melasu (6-, 7- i 8-procentowym). Użyto równolegle szczepów *A*, *M*, *Rb*. Wyniki uzyskane przedstawia tabela V.

Jako kryterium oceny aktywności fermentacyjnej użytych szczepów, przyjęto wyniki uzyskane na 8-procentowym zacierze melasowym, stanowiącym podłoże najtrudniej fermentowane. Najlepsze wyniki zarówno pod względem szybkości fermentacji, jak i ilości acetonu osiągnięto przy użyciu szczepu *M*. Po 48 godzinach fermentacji szczep ten wytworzył 5,55 g/l acetonu; po 62 godzinach (przekroczenie maksimum) zawartość acetonu nieco spadła. Szczep *Rb* po 48 godzinach wytworzył 5,17 g/l, zaś szczep *A* w tym samym czasie 4,86 g/l.

Zgodnie z wymogami przemysłu, w dalszych doświadczeniach zbadano przebieg fermentacji nowo wyodrębnionych szczepów na 6- i 9-procentowym zacierze jęczmiennym, na zacierze melasowo-mącznym i na podłożu melasowym metodą dolewową (mikrofermentacja). Do prób tych, celem porównania, włączono także szczep *Rb*.

W wymienionych wyżej doświadczeniach oznaczano co 2 godziny kwasowość ogólną, *pH*, odbarwianie błękitu metylenowego, przez 30 go-

Tabela V

Wyniki fermentacji na zacierach o trzech stężeniach melasu przy użyciu szczepów *A, M, Rb*

Results of fermentation of molasse mashes (6, 7, 8% molasse); inoculation with strains *A, M, Rb*

1	2	3	4		5	6		7	
Symbole szczepów Denominations of strains	Procent melasu P. c. of molasse	Cukier wyjściowy w % Sugar initial %	Cukier nieodfermentowany w % Final sugar % po — after		Ubytki wagi (gazów) z 100 ml zacieru po 48 godz. Weight loss in g from 100 ml of mash after 48 hours	Kwasowość ogólna w ml 0,1 N NaOH/10 ml Total titrable acidity in ml of 0,1 N NaOH 10 ml of mash		Aceton g/l Acetone g l	
			48 godz. 48 hours	62 godz. 62 hours		48 godz. 48 hours	62 godz. 62 hours	48 godz. 48 hours	62 godz. 62 hours
A	6	3,06	0,134	0,099	2,18	2,6	3,2	4,42	3,98
A	7	3,57	0,243	0,122	2,55	2,7	3,8	4,26	4,79
A	8	4,08	0,549	0,177	2,65	3,0	3,4	4,86	5,30
M	6	3,06	0,124	0,087	2,12	2,1	2,5	4,15	4,13
M	7	3,57	0,248	0,087	2,33	2,5	2,9	4,82	4,54
M	8	4,08	0,272	0,110	2,83	2,7	3,0	5,55	5,41
Rb	6	3,06	0,136	0,099	2,12	2,5	2,7	4,04	4,01
Rb	7	3,57	0,183	0,066	2,47	2,7	2,6	4,95	4,62
Rb	8	4,08	0,572	0,123	2,55	3,3	3,5	5,17	5,39

dzin fermentacji. Po 62 godzinach oprócz wymienionych badań oznaczano również zawartość acetonu, butanolu i etanolu oraz stopień odfermentowania zacieru (gęstość w stopniach Ballinga). Ze względu na to, że nie obserwowano odchyleń od normy w przebiegu kwasowości, *pH* i redukcji błękitu metylenowego, w tabelach podano tylko wyniki końcowe po 62 godzinach.

C. FERMENTACJA NA 6- I 9-PROCENTOWYM ZACIERZE JĘCZMIENNYM

Przeprowadzając kolejno wzmiankowane wyżej doświadczenia, rozpoczęto próby na zacierach mącznych. Wyniki otrzymane na 6-procentowym zacierze jęczmiennym zestawiono w tabeli VI A.

Jak wynika z tabeli VI, najwyższą zawartość acetonu uzyskano przy użyciu szczepu *Rb*, podczas gdy szczepy *A* i *M* dały wyniki bardzo zbliżone. Różnice zaznaczyły się natomiast w ilości wytwarzanego butanolu, na korzyść szczepów *A* i *M*. Najlepsze wyniki pod tym względem uzy-

Tabela VI

Przebieg fermentacji na zacierze jęczmiennym przy użyciu szczepów *A*, *M*, *Rb* (62 godziny)

Results of fermentation of barley-mash. Inoculation with strains *A*, *M*, *Rb* (62 hours)

A. Zacier 6%
Mash 6%

1	2	3	4	5	6	7	8
Symbole szczepów Denominations of strains	Kwasowość ogólna w ml 0,1 N NaOH/10 ml Total titrable acidity in ml of 0,1 N NaOH/10 ml	*pH*	Aceton g/l	Butanol g/l	Etanol g/l	Odfermentowanie w stopniach Ballinga Final mash density (Balling)	Odbarwienie błękitu metylenowego w minutach Time of reduction of methylene-blue, in minutes
A	4,5	5,2	4,213	8,260	2,801	0,00	c. 15
M	4,4	5,2	4,195	7,834	3,026	0,00	c. 15
Rb	4,7	5,1	4,381	7,003	3,920	0,00	c. 15

B. Zacier 9%
Mash 9%

A	5,5	5,1	5,370	11,620	3,519	0,00	5—15
M	5,6	5,3	5,710	11,604	3,477	0,00	5—15
Rb	5,8	5,3	5,590	9,858	4,475	0,00	5—15

C. Zacier: 7% melas + 1% mąki
Mash: 7% of molasse + 1% of barley-meal

A	3,5	5,5	4,230	8,260	2,801	0,40	5—15
M	3,3	5,2	4,200	8,289	3,625	0,20	12—15
Rb	3,1	5,5	4,210	8,205	3,574	0,50	10—15

D. „Mikrofermentacja" metodą dolewową; zacier melasowy
„Microfermentation" — increments method; molasse mash

A	4,7	5,6	4,790	9,837	2,588	1,80	4—12
M	4,1	5,5	5,130	11,326	3,174	1,50	6—15
Rb	5,0	5,7	4,550	9,714	2,312	1,80	4—15

skano przy użyciu szczepu *A*. Przebieg fermentacji na 9-procentowym zacierze jęczmiennym ilustruje tabela VI B.

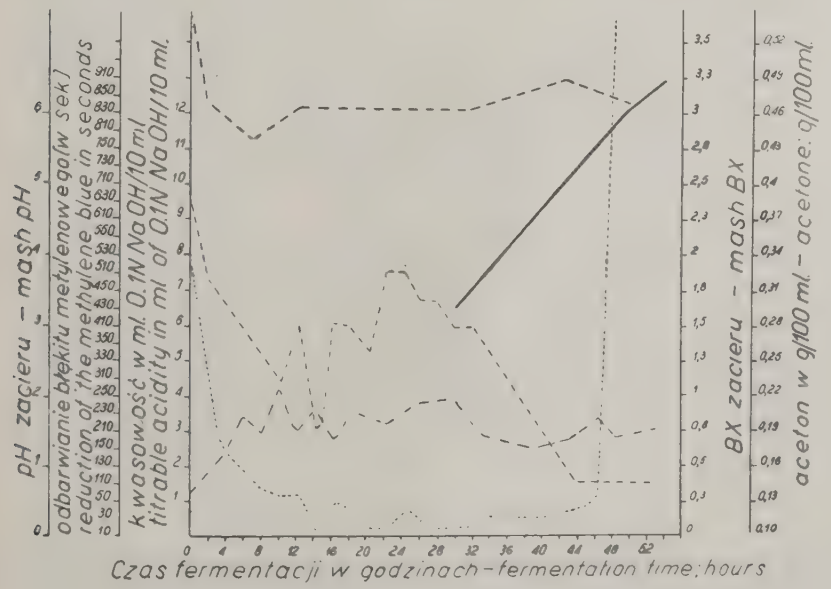
Podobnie jak to obserwowano na 6-procentowym zacierze, ilość butanolu wytwarzana przez szczepy *A* i *M* przewyższała znacznie zawartość alkoholu butylowego, uzyskiwaną przy użyciu szczepu *Rb*. Na 9-procentowym zacierze jęczmiennym najlepsze wyniki, zarówno co do war-

tości acetonu jak i butanolu, dał szczep *M*. Fakt wytwarzania większej ilości butanolu przez szczepy *A* i *M*, należy uznać za korzystny z punktu widzenia przemysłowego.

D. FERMENTACJA NA ZACIERZE MELASOWO-MĄCZNYM

Następne doświadczenie przeprowadzono na zacierze melasowo-mącznym o zawartości 7% melasu i 1% mąki jęczmiennej. Wyjściowa gęstość zacieru melasowego wynosiła około 5° Blg, co odpowiada około 3.5% sacharozy. Tabela VI C przedstawia wyniki porównawczych fermentacji prowadzonych tak jak uprzednio przy zastosowaniu trzech szczepów.

Jak widać z wyników przedstawionych w tabeli VI C badane dwa nowe szczepy oraz szczep *Rb*, wykazały na zastosowanym podłożu w zasadzie zbliżoną aktywność fermentacyjną, jakkolwiek różnice zaznaczyły się w ilości wytwarzanego etanolu.


pH zacieru - mash pH
odbarwianie błękitu metylenowego(w sek.)
reduction of the methylene blue in seconds
kwasowość w ml 0.1N NaOH/10 ml
titrable acidity in ml of 0.1N NaOH/10 ml
BX zacieru - mash BX
aceton w g/100 ml - acetone g/100 ml
Czas fermentacji w godzinach - fermentation time; hours

Rys. 1. Wyniki prób technicznych przy użyciu szczepu *A*

Fig. 1. Results of the plant scale experiments; strain *A*

— — — — *pH*
- - - - - - - *BX*
mash *BX*
. . . . . odbarwianie błękitu metylenowego
reduction of the methylene blue
——— aceton
acetone
—·—·—· kwasowość
titrable acidity

E. MIKROFERMENTACJA

Dalsze próby wykonano według schematu produkcyjnego, na podłożu melasowym. Po rozmnożeniu w probówkach, a następnie w kolbkach, wprowadzono bakterie do kolb, jako odpowiedników małych kadzi fabrycznych. Te ostatnie z kolei przelewano do większych kolb, odpowiadających dużym kadziom. Fermentacja główna rozpoczynała się na około 5-procentowym zacierze melasowym. Następnie, kolejno stosowano w określonych odstępach czasu trzy dolewy zacieru o wzrastającej koncentracji cukru. Ten sposób postępowania miał na celu ułatwienie bakteriom rozmnożenia w niższej koncentracji melasu. Stopniowe dawkowanie następnych, gęstszych partii zacieru melasowego pozwala na lepsze i łatwiejsze odfermentowanie wprowadzanego cukru. Poniżej zamieszczono schemat mikrofermentacji.

Schemat mikrofermentacji

1. probówka — 20% zacier ziemniaczany
2. mała kolbka — 6% zacier jęczmienny
3. kolba (kadź mała) — około 4,5% melasu — 2,5% mąki jęczmiennej.
4. duża kolba (kadź duża) — około 5% melasu
   1. porcja zacieru melasowego — około 10% melasu
   2. porcja zacieru melasowego — około 12,5% melasu
   3. porcja zacieru melasowego — około 15,0% melasu

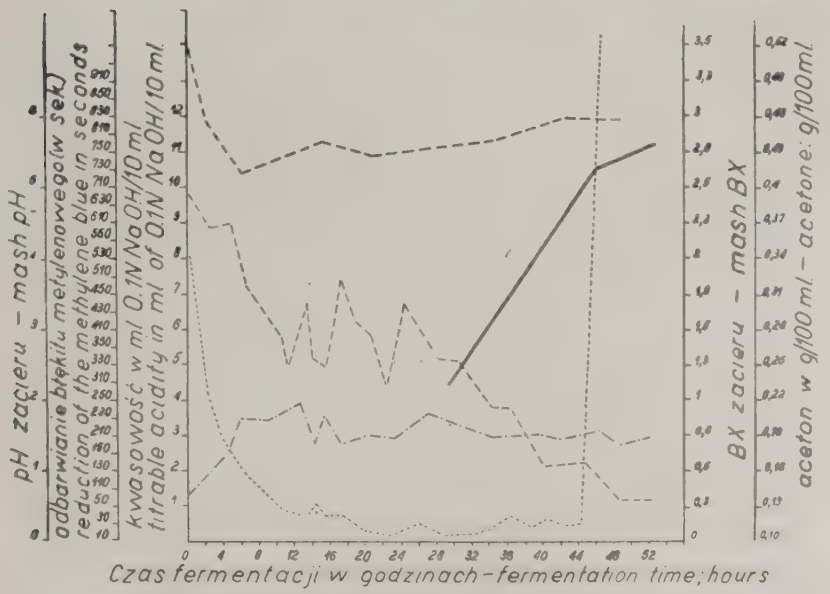
W ten sposób fermentacja przebiegała przeciętnie w stężeniu cukru 4,5-5,0%. Wyniki uzyskane dla mikrofermentacji podano w tabeli VI D. W próbach tych stwierdzono, że zdolność wytwarzania acetonu, butanolu i etanolu przez szczepy *A* i *Rb* była bardzo zbliżona, co pozwala nam uważać je za równorzędne. Natomiast szczep *M* znacznie przewyższa własności fermentacyjne obu wyżej wymienionych szczepów i należy wobec tego uznać go za najlepszy.

W celu sprawdzenia wyników laboratoryjnych badaniami na skalę techniczną przekazano szczepy *A* i *M* do fabryki butanolu i acetonu.

F. FERMENTACJA NA SKALĘ TECHNICZNĄ

Próba na skalę techniczną przeprowadzona została w jednej z naszych fabryk przez kierownika Laboratorium Mikrobiologicznego mgra R. Białasa, kierownika produkcji inż. J. Chełbiego, dzięki uprzejmości dyrektora inż. J. Neya. Obok zamieszczono wyniki prób technicznych przekazane nam w postaci wykresów.

Rezultaty uzyskane w toku prób technicznych potwierdziły ustaloną uprzednio metodami laboratoryjnymi zdolność nowych szczepów do


pH zacieru – mash pH
odbarwianie błękitu metylenowego (w sek.)
reduction of the methylene blue in seconds
kwasowość w ml 0,1N NaOH/10 ml
titrable acidity in ml of 0,1N NaOH/10 ml
BX zacieru – mash BX
aceton w g/100 ml – acetone: g/100 ml
Czas fermentacji w godzinach – fermentation time, hours

Rys. 2. Wyniki prób technicznych przy użyciu szczepu *M*
Fig. 2. Results of the plant scale experiments; strain *M*

– – – – pH
– – – – BX
mash BX
. . . . . odbarwianie błękitu metylenowego
reduction of the methylene blue
——— aceton
acetone
–·–·–·– kwasowość
titrable acidity

łatwego fermentowania melasu, krajowego surowca do produkcji rozpuszczalników. Wydajność rozpuszczalników wyniosła 32,6%. Jak podaje Kovats (1958), przeciętnie wydajność rozpuszczalników waha się od 28 do 32% Nowo wyodrębnione szczepy wykazały zatem wydajność maksymalną.

G. IDENTYFIKACJA WYODRĘBNIONYCH SZCZEPÓW

Na podstawie przedstawionych wyżej badań systematycznych (Bergey 1948, Krasilnikow 1949), jak również badań nad ustaleniem ilości końcowych produktów fermentacji, obydwa wyodrębnione szczepy zaliczono do gatunku *Clostridium acetobutylicum*.

Diagnostykę szczepów *A* i *M* przeprowadzono uwzględniając zarówno ich właściwości morfologiczne jak i fizjologiczne. Uzyskane dane zestawiono poniżej:

Zestawienie cech systematycznych dwu szczepów *A* i *M Cl. acetobutylicum*

A	*M*
Pochodzenie: gleba ogrodowa	Pochodzenie: ziemniak
Komórki wegetatywne; wymiary: 3,6 μ-12,2 μ × 0,7 μ-0,9 μ Najczęstsze wymiary 7,0-7,8 μ×0,8 μ Pałeczki proste, zaokrąglone na biegunach. Występują pojedynczo, parami lub w krótkich łańcuszkach; otoczek nie wytwarzają. Ruchliwość zmienna.	Komórki wegetatywne; wymiary: 4,0-12,0 μ×0,7-0,9 μ Najczęstsze wymiary 7,2-8,0 μ×0,7 μ Pałeczki proste o zaokrąglonych biegunach. Występują pojedynczo, parami lub w krótkich łańcuszkach; otoczek nie wytwarzają. Ruchliwość zmienna.
Przetrwalniki: Clostridia; wymiary: 3.0-6,0 μ×1,8-2,5 μ.	Przetrwalniki: Clostridia; wymiary: 2.8-6,5 μ×1,8-2,4 μ.

Przetrwalniki zlokalizowane ekscentrycznie, rzadko terminalnie; cylindryczne lub owalne. Pojawiają się już w 48-godzinnej hodowli, liczne w hodowlach 72-godzinnych.

W 24- i 36-godzinnej hodowli gramdodatnie; w hodowli 48- i 72-godzinnej liczne komórki gramujemne.

Reakcja na granulozę dodatnia.

Kolonie okrągłe, regularne w zarysie, lekko wzniesione, bezbarwne lub lekko kremowe.

Żelatynę z glikozą upłynniają.

Mleko lakmusowe koagulują i redukują.

Indolu nie tworzy

Beztlenowiec

Temperatura optymalna: 37°

H. UODPARNIANIE PRZECIW FAGOWI

Przeprowadzono również próby uodpornienia szczepów *A, M, Rb* przeciw fagowi, w ramach oddzielnej pracy z ramienia IPF (Kocwa 1955-58, nie publikowane). Posługując się fagiem wyodrębnionym przez Kovatsa stosowano opisaną przez niego metodę (Kovats 1956 a.).

W wyniku tych doświadczeń najmniej wrażliwy okazał się szczep *M*, nieco więcej szczep *A*, zaś najbardziej wrażliwy szczep *Rb*.

STRESZCZENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie aktywnych szczepów *Clostridium acetobutylicum* w środowiskach naturalnych i surowcach roślinnych. Materiałem wyjściowym do badań były: gleba, woda, muł

rzeczny i stawowy, melas, bulwy ziemniaczane i mąka jęczmienna. Spośród objętych badaniami środowisk, uzyskano aktywne szczepy z gleby i bulw ziemniaczanych. Zasadniczo oba te środowiska można sprowadzić do jednego, a mianowicie do gleby, ponieważ jej cząsteczki znajdują się i na bulwach ziemniaczanych. Jakkolwiek i inne środowiska mogą zawierać również aktywne szczepy *Cl. acetobutylicum*, to ich wykrycie wymagałoby przebadania znacznie obszerniejszego materiału wyjściowego.

Spośród wyodrębnionych szczepów, dwa oznaczone symbolami *A* (*A*7/2) i *M* (*M*15/7) odpowiadały normie stawianej przez przemysł aceto-butanolowy. Szczepy *A* i *M* wykazały zdolność fermentowania zarówno podłoży skrobiowych jak i melasowych. Szczep *M* odznaczał się najwyższą aktywnością na podłożach melasowych. Mimo pewnych różnic zaznaczających się w poszczególnych doświadczeniach w ogólnej ocenie uznano szczep nowy *A* i fabryczny *Rb* za równorzędne.

Zarówno szczep *M* jak i *A* wypróbowane były na skalę techniczną, dając zadowalające wyniki.

Badania systematyczne, dotyczące zarówno cech morfologicznych jak i fizjologicznych oraz analiza końcowych produktów fermentacji pozwoliły na stwierdzenie przynależności obu wyodrębnionych szczepów do gatunku *Clostridium acetobutylicum*.

W wyniku prób uodpornienia przeciwko fagowi nowo wyodrębnionych szczepów *A* i *M* oraz fabrycznego szczepu *Rb* ustalono, że szczep *M* był najmniej wrażliwy, więcej wrażliwy okazał się szczep *A*, natomiast najbardziej wrażliwy okazał się szczep *Rb*.

LITERATURA

Beesch S. C., 1948: USA Patent nr 2 439 791.

Beesch S. C., 1952: Acetone-butanol fermentation of sugar. *Ind. Eng. Chem.*, **44**: 1675.

Bergey's Manual of determinative bacteriology 1948: Baltimore.

Bernhauer K., 1939: Gärungschemisches Practicum, Berlin.

Bredemann G., 1909: *Bacillus amylobacter* A. M. et Bredemann in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. *Zentr. Bakter. II*, **23**: 385.

Goodwin L. F., 1920: Modification of the Messinger method for acetone determination. *J. Amer. Chem. Soc.*, **42**: 39.

Kocwa E., 1958: Zaprowadzenie kolekcji czystych kultur *Cl. acetobutylicum* i scharakteryzowanie ich zdolności fermentacyjnych. Prace Zakł. Mikrob. Techn. IPF 1955-1957 (nie opublikowane).

Kovats J., 1956: Zaburzenia w produkcji butanolu wywołane bakteriofagami. *Przem. Spoż.* **10**: 17.

Kovats J., 1958: Poradnik mikrobiologa przemysłu fermentacyjnego i owocowo-warzywnego. Produkcja acetonu i butanolu.

Krasilnikow N. A., 1949: Opredielitiel baktierij i aktinomycetow. Moskwa-Leningrad.

Kutzenoch M., Aschner R., 1952: The degeneration process in the strain of *Clostridium butylicum*. *J. Bact.*, **64**: 829.
Manual of method for pure culture study of bacteria. 1952. Geneva.
McCoy E., Fred E. B., Peterson W. H., Hastings E. G., 1936: A cultural study of the acetone butyl alcohol organism. *J. inf. Dis.*, **39**: 457.
Messinger J., 1888: Titrimetrische Bestimmung von Aceton und Methyl Alkohol. *Ber. deutsch. Chem. Ges.*, **21**: 3366.
Norma resortowa Min. Przem. Roln. i Spoż., 1954: A-13.
Prescott S. C., Dunn C., 1949: Industrial Microbiology. New York.
Przesmycki F., 1951: Zarys bakteriologii praktycznej. *PZWiL*, Warszawa.
Robinson G. C., 1922: A study of the acetone and butyl alcohol fermentation of various carbohydrates. *J. Biol. Chem.*, **53**: 125.
Speakman H. B., 1923: Molecular configuration in the sugar and acid production by *Bacillus granulobacter pectinovorum*. *J. Biol. Chem.*, **58**: 395.
Stahly G. L., Osburn O. L., Werkmann C. H., 1934: Quantitative determination of acetone and ethyl-, butyl- and isopropylalcohols in fermentation liquors. *Analyst*, **59**: 319.
Underkofler L. A., Hickey R. J., 1954: Industrial Fermentations. New York.
Weyer E. R., Rettger L. F., 1927: A comparative study of six different strains of the organisms commonly concerned in large scale production of butyl alcohol and acetone by the biological process. *J. Bact.*, **14**: 399.

E. Kocwa, K. Matusiak and *H. Wcisło*

ISOLATION OF *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* FROM ITS NATURAL HABITAT

Summary

It was the aim of the authors to examine the occurrence of *Cl. acetobutylicum* in soil, river mud, potatoes, barley flour, molasses, in order to find new strains of high fermentative activity. The majority of such strains were isolated from cultivated soil and from stored potato-bulbs. The fermentative activity of these strains was variable; two strains (*M* and *A*) among isolated ones were characterized by relatively short period of fermentation and by high level of acetone and butanol produced. In this respect strains *A* and *M* compare favourably with strain *Rb*, used in production. The best results with strain *M* were obtained on molasses--media, with strain *A* — on starch-media. Experiments conducted on the technical scale in one of productive plant — gave satisfactory results. The results are shown in tables and graphs.

The *M* strain was relatively resistant and strain *A* somewhat less resistant to the specific bacteriophage, highly virulent for the productive strain *Rb*.

SPIS TREŚCI — CONTENTS

Str.
page

1. T. M. Lachowicz: Mechanizm powstawania form opornych na penicylinę
Mechanism of development of penicillin-resistance — A review . . 107
2. T. M. Lachowicz: The mechanism of development *in vitro* of penicillin-resistant variants of *Staphylococcus aureus*. I. The effect of drug concentration on the number of resistant forms
Mechanizm powstawania penicylinooporności u gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus in vitro*. I. Wpływ stężenia antybiotyku na ilość opornych form 133
3. T. M. Lachowicz: The mechanism of development *in vitro* of penicillin-resistant variants of *Staphylococcus aureus*. II. Further investigation on the fluctuation test in the study of origin of penicillin-resistance
Mechanizm powstawania penicylinooporności u gronkowca złocistego. II. Zastosowanie testu fluktuacyjnego do badań nad mechanizmem powstawania form opornych *in vitro* 143
4. I. Reifer i Możejko-Toczko: Mikrobiologiczna metoda ilościowego oznaczania lupaniny
Microbiological assay of lupanine 151
5. M. Możejko-Toczko: Rozkład lupaniny przez *Pseudomonas lupanini*
Decomposition of lupanine by *Pseudomonas lupanini* 157
6. J. Kączkowski i M. Możejko-Toczko: Bakterie rozkładające alkaloidy tropanowe
Bacteria decomposing tropane alkaloids 173
7. T. Wróbel: Wpływ liofilizacji szczepów *Rhizobium* na aktywność ich współżycia z roślinami
Influence of the lyophilization of *Rhizobium* on its symbiotical activity 181
8. T. Kłosowska i K. Pawłowska: Próby wyjaśnienia bakteriobójczego działania borowin typu wysokiego
Attemps of explaination of bacteriostatic action of high-moor type marshes 191
9. S. Bujak: Wpływ szczepienia ogórków bakteriami fermentacji mlekowej na jakość produktu po jego zakiszeniu
Influence of lactic acid bacteria inoculation of cucumbers on the quality of the product after its fermentation 199
10. M. Kujawski i K. Piller: Badania nad otrzymywaniem pleśniowych preparatów enzymatycznych — amylolitycznych. Cz. II. Opis morfologiczny czterech szczepów *Aspergillus oryzae* oraz wpływ czasu hodowli na ich aktywność amylolityczną
Studies on the production of fungal amylases. II. Morphology of four strains of *Aspergillus oryzae* and the effect of the time of growth on their amylolytic activity 205
11. E. Kocwa, K. Matusiak i H. Wcisło: Wyodrębnianie aktywnych szczepów *Clostridium acetobutylicum* ze środowisk naturalnych
Isolation of *Clostridium acetobutylicum* from its natural habitat . . 215

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej, nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, skrytka pocztowa nr 73.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) muszą być uprzednio akceptowane przez tłumacza Redakcji; należy do nich dołączyć wersję polską i streszczenie w języku polskim. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku polskim oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, dwukropek, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie, 75 odbitek nie zszywanych — po cenie zryczałtowanej (około 2 zł za stronę druku).

* * *

Zgodnie z poleceniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, począwszy od tomu X (rocznik 1961) prace oryginalne będą publikowane w języku angielskim lub francuskim.

Zmiana ta będzie stopniowo wprowadzana w życie już w 1960 r.

W związku z powyższym objętość prac zostanie ograniczona do maksimum 1 arkusza wydawniczego. Prace mogą być nadsyłane w wersji polskiej z załączonym słownikiem stosowanych terminów fachowych w języku publikacji. Tłumaczenie w takim przypadku wykona Redakcja na koszt autora. Prace przygotowane w wersji obcej muszą uprzednio uzyskać akceptację jednego z tłumaczów Redakcji. Do wersji obcej należy dołączyć 1 egzemplarz w wersji polskiej.

Cena zł 25.—